

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Patent
Attorney's Docket No. 026350-058

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)	
Yoji SAKAGAMI <i>et al.</i>)	Group Art Unit: 1638
Application No.: 09/880,006)	Examiner: Russell Kallis
Filed: June 14, 2001)	Confirmation No.: 4690
For: Promoter Derived from Phytosulfokine Precursor Gene)	

COMMUNICATION — SUBMISSION OF SWORN TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

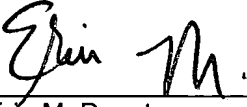
In addition to the certified copy of the foreign application to which Applicants claim priority,
Japanese Patent Application No. 2000-179826, filed June 15, 2000, Applicants hereby also submit a
sworn translation thereof.

Respectfully submitted,
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: April 2, 2004

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

By:


Erin M. Dunston
Registration No. 51,147



Patent
Attorney Docket No. 026350-058

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Yoji SAKAGAMI et al.

Application No.: 09/880,006

Filing Date: June 14, 2001

Title: Promoter Derived from Phytosulfokine Precursor Gene

Group Art Unit: 1638

Examiner: Russell Kallis

Confirmation No.: 4690

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: JAPAN

Patent Application No(s): 2000-179826

Filed: June 15, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

Date: April 2, 2004

By

Erin M. Dunston

Registration No. 51,147

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : June 15, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-179826

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on December 15, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2000-3103703

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : June 15, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-179826

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on December 15, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2000-3103703

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月15日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-179826

出 願 人

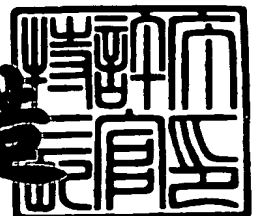
Applicant (s):

名古屋大学長

2000年12月15日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3103703

【書類名】 特許願

【整理番号】 2000P039

【提出日】 平成12年 6月15日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A01H 1/00
C12N 15/00

【発明の名称】 ファイトスルフォカイン前駆体遺伝子のプロモーター

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千草区北千種 1 - 9 - 1 1 仲田住宅 8
 - 3 6

 【氏名】 坂神 洋次

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千草区千代が丘 1 千代が丘団地 1 0 4
 - 2 0 5 号室

 【氏名】 楊 和平

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市千草区唐山町 3 丁目 3 4 フォーブル Y
 1 0 5

 【氏名】 松林 嘉克

【特許出願人】

 【識別番号】 391012224

 【氏名又は名称】 名古屋大学長 松尾 稔

【代理人】

 【識別番号】 100059258

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【選任した代理人】

 【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100098383

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 純子

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709851

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ファイトスルフォカイン前駆体遺伝子のプロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) に示す塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す、塩基番号 (- 3 3 5 9) - (- 1) で示される塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(b) (a) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、下流に存在する構造遺伝子の発現を活性化する作用を有する、プロモーター。

【請求項 2】 以下の (c) または (d) に示す塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(c) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 (- 1 9 1 1) - (- 1) で示される塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(d) (c) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、下流に存在する構造遺伝子の発現を活性化する作用を有する、プロモーター。

【請求項 3】 以下の (e) または (f) に示す塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(e) 配列表の配列番号 3 に示す、塩基番号 (- 1 0 3 4) - (- 1) で示される塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(f) (e) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、下流に存在する構造遺伝子の発現を活性化する作用を有する、プロモーター。

【請求項 4】 以下の (g) または (h) に示す塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(g) 配列表の配列番号 4 に示す、塩基番号 (- 5 6 3) - (- 1) で示される塩基配列からなることを特徴とする、プロモーター。

(h) (g) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、下流に存在する構造遺伝子の発現を活性化する作用を有する、プロモーター。

【請求項 5】 配列表の配列番号 5 に示す、塩基番号 (- 3 3 5 9) - (2 0 3 3) で示される塩基配列からなることを特徴とする、ファイトスルフォカイン前

駆体をコードする遺伝子。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 4 のプロモーターを導入した、プラスミドベクター。

【請求項 7】 請求項 1 ないし 4 のプロモーターを植物細胞に導入した、形質転換植物細胞。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 4 のプロモーターを植物体に導入した、形質転換植物体。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 4 のプロモーターを植物に導入することにより、当該植物に導入した外来の構造遺伝子又は当該植物に内在する構造遺伝子の発現を活性化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、イネのファイトスルフォカイン前駆体遺伝子に由来するプロモーター及び当該プロモーターを導入して外来の構造遺伝子の発現を活性化させた形質転換植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

植物細胞工学の分野において、外来遺伝子を植物に導入して過剰発現させるために、目的遺伝子の前にプロモーター配列を繋げる事が一般的に行われている。外来遺伝子の発現は、その様なプロモーターの存在がなくては不十分であることが多いからである。本目的のために種々のプロモーターが使用されているが、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターを用いた方法が、本技術分野において最も汎用されている。ここでプロモーターとは、構造遺伝子の 5' 上流に存在する制御的な遺伝子領域のことであり、RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合することが、転写の開始シグナルとなると言われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

上記のカリフラワーモザイクウイルス (CAMV) の 35S プロモーターは、

遺伝子を過剰発現させるための優れた方法であるが、導入する外来遺伝子や導入の対照である植物種によっては必ずしも導入した遺伝子の発現が十分でない場合もあり、より活性の高いプロモーターが求められていた。そこで、CAMV35Sプロモーターより活性の高い、新規のプロモーターを得る事が本発明の課題である。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ペプチド性の植物の増殖因子であるファイトスルフォカイン（*phyto-sulfokine*：PSK）に注目し、検討を行ってきた。PSKは一度培養に使用したいわゆる「馴化培地」中に含有される植物細胞の増殖因子の一つであり、いわゆるオートクライン的に作用することが知られている。一般的に植物細胞を培養するには、既知のホルモンや種々の栄養素を培養液に添加することが行われているが、培養そのものが困難である植物種や増殖が非常に遅い植物種が存在する。また細胞密度が非常に低い場合にも、培養が困難となるが、それらの場合に細胞増殖を活性化する目的に、PSKが有効である。PSK- α 及びPSK- β の本体は、翻訳後修飾によりそのチロシン残基が硫酸化された、以下の構造から成るペプチドであることが知られている。

PSK- α ：Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln

PSK- β ：Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr

【0005】

上記のPSK- α 及びPSK- β は、前駆体の形で生合成されて、トランスゴルジネットワークを経由する間に、硫酸化及びプロセッシングを受けて、PSKが切り出されることが知られている。その様な前駆体である、イネPSK（*Oryza sativa phyto-sulfokine*：OsPSK）遺伝子のcDNA塩基配列は、cDNAクローニングの手法により既に解析されている。また、そのようにして得たcDNA及び当該cDNAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を特許出願し、それらにつき特許登録されている（特許第3038381号、未公開）。当該遺伝子を植物に導入することにより、植物細胞の増殖を促進させることが可能であると思われる。

【 0 0 0 6 】

本発明者は上記の知見に注目し、O s P S K 遺伝子の発現を制御しているプロモーターを得ることを試みた。ところで、上記（特許第 3 0 3 8 3 8 1 号）の遺伝子配列は m R N A を鋳型として逆転写酵素により合成された c D N A の塩基配列であるために、遺伝子の転写されない領域やイントロンに対応する部分は含んでいない。プロモーターの様な制御的な領域は転写されないことが一般的であるために、O s P S K のプロモーターを得るためには、細胞の全 D N A よりゲノムライブラリーを作製し、制御領域を含む O s P S K のゲノム遺伝子を得る必要がある。そこで本発明者らは、O s P S K のゲノムライブラリーを作製し、c D N A をプローブとしてブランクハイブリダイゼーションによりクローニングを行い、転写されない領域やイントロンを含む、P S K 前駆体の全ゲノム配列を得た。当該ゲノム配列中において、読み枠（オープンリーディングフレーム）の上流には、種々のコンセンサス配列を含むプロモーターが存在することが判った。当該プロモーターによる、下流に組み込まれている β -グルクロニダーゼ（G U S）遺伝子の発現の活性化を検討したところ、当該プロモーターは、C A M V 3 5 S プロモーター以上に G U S 遺伝子の発現を活性化した。よって、当該プロモーターは構成的に外来遺伝子を発現させる有用なツールである事が示された。

【 0 0 0 7 】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列表の配列番号 5 に示し、塩基番号（- 3 3 5 9）-（2 0 3 3）で示される塩基配列からなることを特徴とする、ファイトスルフォカイン前駆体をコードする遺伝子である。当該遺伝子は、イネ培養 O c 細胞よりゲノム D N A ライブラリーを作製し、³²P ラベルした O s P S K の c D N A を用いて、ブランクハイブリダイゼーションにより当該ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られた、P S K 前駆体をコードするゲノム遺伝子配列である。既に得られている、P S K 前駆体をコードする c D N A の塩基配列と比較すると、当該ゲノム遺伝子配列は、2 つのエクソンと 1 つの大きなイントロンより構成されており、5 つのアミノ酸より成る P S K をコードする配列は、第二のエクソン中に存在していた。配列表の配列願号 5 において、塩基番号（1）-（1 8 5 8

）は転写領域である。そのうち、第一エクソンの部分は（1）－（245）であり、アミノ末端シグナルペプチドなどをコードしている。（246）－（1395）はイントロンであり、（1396）－（1858）はPSKコード領域を含む第二エクソンである。また、（1396）－（1521）は、3' 下流近隣配列である。塩基番号－68の位置にTATA boxであろうと思われる配列が見出され、更に本配列の上流に、いくつかの調節因子と成り得るコンセンサス配列が見出された。即ち、1つのCAAT box、2つのCCAAT box、3つの剪断応力反応因子（SSRE）、1つのエンハンサーコア様配列及び3つのE boxが見出された。これらの配列は多くの生物において共通に存在すると認められているコンセンサス配列であり、転写制御に関与していると言われている。即ち、これらコンセンサス配列に各配列固有の蛋白質が結合すると、蛋白質とDNAの相互作用により転写開始の頻度が調節される事が知られている。

【0008】

下記の実施例で示す様に、OsPSK遺伝子の5' 領域と β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子とを融合させたプラスミドを構築した。OsPSK遺伝子の5' 領域がGUS活性に及ぼす影響を検討したところ、OsPSK遺伝子の5' 制御因子を含む領域は、CAMV35Sプロモーター以上にGUS活性を促進する、という知見が得られた。OsPSK遺伝子の5' 領域に由来する、その様なプロモーターの塩基配列は、配列表の配列番号1に示す、塩基番号（－3359）－（－1）で示される塩基配列により特定される。当該プロモーターは、OsPSK遺伝子の転写調節領域であり、後の実施例においてプラスミドpIG121－6（図5参照）に組み込んだ配列に相当する。この配列は、OsPSK遺伝子においてプロモーター活性を示す最長の領域であり、これ以上長い配列を使用するとプロモーター活性は顕著に低下する。

【0009】

OsPSK遺伝子の5' 領域は、配列表の配列番号1記載の配列より短い配列においても、プロモーターとしての活性を保持する。配列表の配列番号2に示す、塩基番号（－1911）－（－1）で示される塩基配列からなることを特徴とする配列により特定されるプロモーターは、その様なプロモーターの一つである

。この領域は、後の実施例においてプラスミド p I G 1 2 1 - 4（図 5 参照）に組み込んだ配列に相当する。この配列は、O s P S K 遺伝子において、最大のプロモーター活性を示す領域に相当する。

【 0 0 1 0 】

また、配列表の配列番号 3 に示す、塩基番号（- 1 0 3 4） - （- 1）で示される塩基配列からなることを特徴とする配列により特定される領域も、プロモーターとしての活性を保持する領域の一つである。O s P S K 遺伝子に由来する当該領域は、後の実施例においてプラスミド p I G 1 2 1 - 3（図 5 参照）に組み込んだ配列に相当する。

【 0 0 1 1 】

また、配列表の配列番号 4 に示す、塩基番号（- 5 6 3） - （- 1）で示される塩基配列からなることを特徴とする配列により特定される領域も、プロモーターとしての活性を保持する領域の一つである。O s P S K 遺伝子に由来する当該領域は、後の実施例においてプラスミド p I G 1 2 1 - 2（図 5 参照）に組み込んだ配列に相当する。この配列は、O s P S K 遺伝子においてプロモーター活性を示す最短の領域であり、これ以上短い配列を使用するとプロモーター活性は顕著に低下する。

【 0 0 1 2 】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となる DNA の特定の部位に、当該 DNA の基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとするのが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号 1 に示すプロモーターの一部が欠失、置換若しくは付加されたプロモーターとは、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、かつ下流に存在する構造遺伝子の発現を活性化するプロモーターである。その様なプロモーターは、配列番号 1 に示す塩基配列と比較して 7 0 % 以上、好ましくは 8 0 % 以上、更に好ましく

は 9 0 % 以上の相同性を有する。また、その様なプロモーターにおいては、配列番号 1 に示す塩基配列と比較して、欠失、置換若しくは付加した塩基数は 2 0 個以下、好ましくは 1 0 個以下、更に好ましくは 5 個以下である。また、その様なプロモーターにおいては、ストリンジェントな条件下で、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドとハイブリッドの形成が可能である。なお、配列表の配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 に示すプロモーターの一部が欠失、置換若しくは付加されたプロモーターという記載も、本明細書中においては同様の意味を有するものである。

【 0 0 1 3 】

更に、上記のイネ O s P S K 遺伝子由来のプロモーターを導入したプラスミドも本発明の範囲内である。実施例においては、C a M V 3 5 S プロモーターと G U S レポーター遺伝子を含有する p I G 1 2 1 プラスミドを使用した。それに限定されるものではなく、例えば p I G 1 2 2 プラスミド、p B I 1 0 1、p B I 1 2 1、p B I 2 2 1、p A c t - n o s / H m z、p M A T 0 3 7、p T A 7 0 0 1 および p T A 7 0 0 2 など、本技術分野で汎用されている他のプラスミドを使用することもまた可能である。

【 0 0 1 4 】

また、本発明のプロモーターを導入して、外来遺伝子の発現を活性化した形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。本発明のプロモーターを導入して、外来遺伝子を活性化させる植物の例としては、イネ、ユリ、トウモロコシ、アスパラガス、コムギ等の単子葉植物、またタバコ、シロイヌナズナ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。原理的には、あらゆる植物に本発明のプロモーターを導入して、外来遺伝子の発現を活性化することが可能である。形質転換を行う際に、実施例においてはアグロバクテリウム ツメファシエンス L B A 4 4 0 4 株を用いているが、それに限定されるものではなく、遺伝子を導入する植物の種に応じて本技術分野で一般的に使用されているアグロバクテリウム菌株を、適宜選択して用いることができる。

【 0 0 1 5 】

また、プロモーターの下流に位置する様に導入して、その発現を活性化させる

対象である外来の構造遺伝子として、原理的にはあらゆる有用な構造遺伝子を採用することが可能である。実施例ではGUS遺伝子を導入しているが、それに限定されるものではない。導入する外来遺伝子の好ましい例としては、植物の成長を促進する因子をコードする遺伝子、各種の環境ストレスに対する耐性遺伝子、植物の病害に対する耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子および有用二次代謝産物の合成酵素遺伝子などを挙げることができる。

【0016】

また、その様にして作製した外来遺伝子の発現を活性化させた形質転換植物細胞より得られた植物体、及び形質転換植物細胞を作製する方法も、本発明の範囲内である。本発明を、イネ培養細胞を用いた実施例で詳細に説明するが、上記の記載及び下記の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0017】

【実施例】

（植物細胞培養）

イネ培養Oc細胞（Baba et al., 1986）を、120rpm、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の暗条件下で、1mg/Lのジクロロフェノキシ酢酸（2, 4-D）を添加した新鮮なMurashige and Skoog（MS: Murashige and Skoog, 1962）培地中で、通常は2週間の間隔で継代培養した。

【0018】

（ゲノムDNAの抽出及びサザンブロット解析）

CTAB法（Murry and Thompson, 1980）を用いて、14日培養したイネOc培養細胞よりゲノムDNAを抽出し、制限エンドヌクレアーゼにより分解し、0.8%（w/v）アガロースゲル上での電気泳動により分離した。アルカリ転写バッファー（0.4N NaOH/0.6N NaCl）中で、そのゲルをビオダイニロン膜（パル、ポートワシントン、NY, USA）上に転写した。5×SSC、0.5% SDS、5×デンハルト溶液及び500μg/mlサケ精子DNAの溶液中で、ランダムプライムドDNAラベリングキット（タカラ、東京、日本）を用いて³²PラベルしたOsPSKのcDNAを用いて、50℃又は60℃でサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後

、2×SSCを用いて25℃で15分間の条件で3回、次いで0.1%SDSを含む0.2×SSCを用いて50℃又は65℃で15分の条件で3回洗浄した。

【0019】

(ゲノムライブラリーの構築及びスクリーニング)

ゲノムDNA (50 μ g) をSau3AIで部分的に制限分解して、9から23 kbの範囲の大きさのBamHI感受性断片を作成した。ゲノム断片 (0.3 μ g) を、BamHI及びEcoRI (ストラタジーン、ラホヤ、CA、USA) により分解しておいたEMBL3ベクターのBamHI部位へ挿入し、ギガパックIIIゴールドパッケージングエキストラクト (ストラタジーン) により包み込んだ。³²PラベルしたOsPSKのcDNAを用いて、ブランクハイブリダイゼーションによりゲノムライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーション及び洗浄を、上述した通りの強い条件下において、65℃で行った。

【0020】

(サブクロニング及びDNA配列決定)

陽性ゲノムクローンの制限地図解析を、単独及び二重の制限酵素消化により行った。OsPSK遺伝子を有している1シリーズの断片を、陽性ファージの一つから切り出して、ゲルで精製し、pBluescript II-KS (pBS) の、対応する部位の中へサブクロニングした。キロシーケンシングキット (タカラ) を用いて、製造業者の推奨するプロトコルにより、DNA配列が欠損したクローンが生成した。欠損した断片を含むプラスミドを大腸菌株JM109中へ導入し、両鎖について完全に配列決定した。ビッグダイターミネーターサイクルシーケンシングキット (アプライドバイオシステムズ、フォスター、CA、USA) を用いて、二重鎖DNAの配列を決定し、ABIプリズム310ジェネティックアナライザー (アプライドバイオシステムズ) を用いて、製造業者のプロトコルに従ってDNA配列データの解析を行った。

【0021】

(転写開始部位の決定)

プライマー伸長解析及びS1マッピングにより、転写開始部位を確定した。2週齢のOc培養細胞より抽出した全RNA及び5'-AGCAGGAGGAGAGCAAGGCATAGGAGG

CAGAG-3'の配列を有する32塩基長のプライマーを両者の解析に用いた。このプライマーはOsPSKのcDNA中において、ATG開始コドンの32塩基下流の領域に相補的な配列を有する。当該オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端を、10UのT4ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラ）及び30 μ Ciの[γ - 32 P]ATP（3000 μ Ci/mmol）によりラベル化した。末端をラベル化したプライマーを、10 μ gの全RNAと、60℃で1時間アニールした。公知の方法（Sambrook et al.,1989）により、20Uのモロネイネズミ白血病ウイルス逆転写酵素（ストラタジーン）を用いて、30℃で1時間、プライマー伸長反応を行った。S1マッピングのために、OsPSK遺伝子由来の3.6kbのEcoRI断片及び末端ラベルしたプライマーを、一本鎖DNAを合成する目的で使用した。315bpの断片を切り出して、PstIにより合成したDNAから精製し、S1プローブとして使用した。プローブを30 μ gの全RNAと60℃でハイブリダイズし、その後にその混合液を300ユニット/mlのS1ヌクレアーゼ（タカラ）と30℃で30分間インキュベートした。両実験における反応生成物を、7M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル上で、同時に解析した。

【0022】

（キメラ遺伝子の構築）

pIG121プラスミドは、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35Sプロモーターとトウモロコシのカタラーゼ遺伝子の改変イントロン、及びGUSレポーター遺伝子を含む（Akama et al.,1992）。このCaMV35S-イントロン-GUSレポーター遺伝子は植物細胞中で発現するが、アグロバクテリウムツメファシエンス（*A. tumefaciens*）の細胞内では発現しない（Ohta et al.,1990）。pIG121はカナマイシン耐性遺伝子を有しており、それを用いて形質転換体を選抜することができる。pIG121プラスミドをHindIII-XbaIにより分解することにより、CaMV35Sプロモーターを除去することができる。OsPSK遺伝子の5'領域由来の種々の断片を、バイナリーベクターのHindIII-XbaI領域に挿入する事により、キメラ遺伝子を構築した。OsPSK遺伝子の5'領域由来の241bpのPst

I-BglII断片を、pBSの中のPstI-BamHI部位へサブクロニングした。その断片を、pBS-1からHindIII-XbaIにより切り出して、プロモーターを欠損した、pIG121の同様の部位の間へクロニングし、pIG121-1を構築した。EcoRV-BglII断片を含む、pBS-2由来の662bpのHindIII-XbaI断片を、プロモーターを欠損したpIG121の同様の部位に導入することにより、pIG121-2を作製した。OsPSK遺伝子の5'領域の、1.1kbのHindIII-BglII断片を、pBSのHindIII-BamHI部位へサブクロニングしてpBS-3を作製した。pBS-3に由来する1.1kb断片を、プロモーターを欠損したpIG121のHindIII-XbaI部位へ導入し、pIG121-3プラスミドを作製した。OsPSK遺伝子の5'領域の2kbのBglII-BglII断片を、pBSのBamHI部位へサブクロニングして、pBS-4を作製した。877bpのHindIII-HindIII断片を、pBS-4から切り出して、pBS-3の同じ部位へ可能な両方向において挿入し、pIG121-4とpIG121-5を作製した。OsPSKの3.7kbのEcoRI-EcoRI断片を単離して、pBSの同様の部位へクロニングし、pBS-5を作製した。その後pBS-5プラスミドをHindIIIにより開裂し、2.3kbの断片をpIG121-3の同様の部位へ可能な両方向において挿入し、pIG121-6とpIG121-7を構築した。

【0023】

尚、pIG121-1に導入した配列は、イネファイトスルフォカイン前駆体遺伝子のゲノムDNA配列である配列表の配列番号5において、塩基番号(-148) - (-1)に相当する部分である。pIG121-2に導入した配列は、塩基番号(-563) - (-1)に相当する部分である。pIG121-3に導入した配列は、塩基番号(-1034) - (-1)に相当する部分である。pIG121-4に導入した配列は、塩基番号(-1911) - (-1)に相当する部分である。pIG121-5に導入した配列は、pIG121-4と同様であるが、塩基番号(-1911) - (-1034)に相当する部分が逆方向となっている。pIG121-6に導入した配列は、塩基番号(-3359) - (-1

）に相当する部分である。pIG121-7に導入した配列は、pIG121-6と同様であるが、塩基番号（-3359）-（-1034）に相当する部分が逆方向となっている。

【0024】

（イネOc細胞のアグロバクテリウムによる形質転換）

トリペアレンタルメイティングにより、アグロバクテリウムツメファシエンスLBA4404株中へコンストラクトを導入した。アグロバクテリウムツメファシエンス細胞を、50mg/Lのカナマイシンを含むAB寒天培地中で、暗条件下30℃で3日間生育させた。その細菌を小さなスプーンで集め、OD₆₀₀が0.2の密度でAAM培地（Yang et al., 2000）中に懸濁した。感染に先だって1.0mg/Lの2, 4-Dを添加した新鮮なMS培地上において、25℃で3日間前培養したOc細胞を、90mm×20mmのペトリ皿（テルモ、東京、日本）の中で4mlの細菌懸濁液に浸した。プレートをパラフィルムで密閉し、28℃で3日間、暗条件で共培養を行った。3日後、培養物をファルコン2097チューブに集めた。1000rpmで1分間の遠心分離（MX-160遠心機、TMA-27アングルローター：トミー）により、Oc細胞を回収した。Oc細胞をMS培地中に再懸濁し、穏やかに攪拌することにより混合し、その後1000rpmで1分間遠心した。遠心分離後、上清は廃棄した。この洗浄過程を3回から5回繰り返して、アグロバクテリウムツメファシエンス細胞を除外した。洗浄したOc細胞を、1.0mg/mlの2, 4-D、50mg/Lのカナマイシン、及び250mg/mlのセフトキシムを添加した、新鮮なMS培地上で培養し、形質転換した細胞を選抜した。

【0025】

（GUS活性の定量的解析）

それぞれのコンストラクトにつき、5つ以上の独立した形質転換細胞株を選抜培地上で7日間培養し、GUS活性を測定するのに用いた。GUS抽出バッファー中において、形質転換したOc細胞から全ての可溶性蛋白質を単離した（Jefferson et al., 1987）。4-ウンベリフェリル-β-D-グルクロニド（シグマ、セントルイス、MO、USA）を用いた、Jeffersonらの蛍光反応法により、

GUS活性を定量的にアッセイした。Bradford (1976) の方法により、バイオラッドラボラトリーのキットにより、蛋白質の量を決定した。

【0026】

(RNAの単離及びノザンブロット解析)

pIG121-4プラスミドにより形質転換したOc細胞を、異なった組み合わせの植物ホルモンを添加したMS培地中において、0、12、24、48及び72時間培養した。即ち、2mg/Lの2、4-Dのみ、2mg/Lの6-BAのみ、又は1mg/Lの2、4-D及び6-BAのそれぞれを、MS培地に添加した。公知の方法(Chomczynski,1993)によりサンプルから単離した全RNA(レーンあたり20μg)を変性させて、2.2Mフォルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲル上で分画した。次いで、20×SSC中で、ビオダイナイル膜(Pall)にRNAを転写した。上述したように、gusA遺伝子のランダムにプライムしたプローブを、そのフィルターとハイブリダイズさせた。

【0027】

(OsPSK遺伝子のコピー数)

本発明者らは、植物から同定したペプチド成長因子であるPSK-αの前駆体をコードする、イネにおけるOsPSKのcDNAを過去に解析している。OsPSKのcDNAに相当するゲノムクローンの単離に先立ち、イネのゲノム中におけるこの遺伝子のコピー数を、ゲノミックサザンブロッティングにより検討した。全長のOsPSKのcDNAをプローブとして用いた、緩和な条件下におけるDNAブロット解析により、DNA中の1つのバンドのみが3つの異なる制限酵素により分解されることが示された。EcoRIのみが例外であり、EcoRI分解により、強くハイブリダイズするバンドが2つ、及び弱くハイブリダイズするバンドが1つ生成した(Yang et al.,1999)。サザンブロットがプローブと厳しい条件下でハイブリダイズしたとき、EcoRIにより分解されたDNAの中で強いバンドだけが検出された。これらの2つのバンドがハイブリダイズすることは、OsPSKのcDNAのコーディング領域中において残っている制限部位より予測された。この知見を証明するために、OsPSKのcDNA 5'末端に由来する300bpの断片を用いて、ブロッティングを再び行った。予想し

た様に、3.6 kbの1つのバンドだけが、緩和な条件下でも、厳しい条件下でもハイブリダイズした。図1に、OsPSK遺伝子のDNAプロット解析を行った結果を示す。図1において、Oc細胞より単離したゲノムDNAを、BamHI（レーン1）、EcoRI（レーン2）、XbaI（レーン3）、XhoI（レーン4）で分解を行い、OsPSKのcDNAの5'末端由来の放射標識プローブとハイブリダイズさせた。その結果は、OsPSKは単一コピーの遺伝子であることを示している。実際に、ゲノミックライブラリーのスクリーニングを行ったところ、ゲノミッククローンが1種だけ単離された。

【0028】

（OsPSK遺伝子の単離）

λEMBL3ファージとイネOc培養細胞より調製したSau3AIで消化したDNA断片より、ゲノミックライブラリーを構築し、OsPSKのcDNAをプローブとして用いて、そのライブラリーをスクリーニングした。OsPSK遺伝子より得られた断片を有する重複クローンが、OsPSK遺伝子より得られた（図2B）。図2Bにおいて、OsPSK遺伝子断片を含む3つのゲノムクローンを示す。それらのクローンを、λEMBL3/3-1、λEMBL3/5-3及びλEMBL3/7-1と名付けた。これらのクローンは3つのサブグループに分類され、イネのゲノムDNAの45 kb以上の領域にわたり重複していた。OsPSKのゲノム構造及び制御領域の解析を始めるのにあたって、サザンハイブリダイゼーションのみでなく、単独及び二重の制限酵素分解により、3つのλEMBL3ファージクローンについて制限酵素地図を作製した（図2B）。OsPSK遺伝子についてのゲノム断片の制限酵素地図を図2Aに示す。図2において、BaはBamHIの制限酵素部位を、BgはBglIIの制限酵素部位を、EIはEcoRIの制限酵素部位を、EVはRcoRVの制限酵素部位を、HはHindIIIの制限酵素部位を、PはPstIの制限酵素部位を、それぞれ示す。22.8 kbのλEMBL3/7-1挿入部位が、5'上流部位、OsPSKのcDNAに相当する全長の転写配列、コードしないイントロン及び3'下流領域を含む、全OsPSK遺伝子を含んでいることが見出された。図2Cに、OsPSK遺伝子のゲノム構成を示す。図2Cにおいて、OsPSK遺伝子の転

写方向を矢印で、イントロンを白抜き部分で、エキソンの非コード部分を陰影部分で、コード部位を縞模様の部分で、第二エキソン中の P S K- α をコードする部分を白色のバーで、それぞれ示す。図 2 C の 327 b p と記載したバーは、ゲノム DNA ハイブリダイゼーションに用いたプローブを示す。

【0029】

(O s P S K 遺伝子の転写開始点の決定)

O s P S K 遺伝子の転写開始点を、プライマー伸長解析及び S1 マッピングにより決定した。図 3 において、S1 ヌクレアーゼの反応生成物（レーン 1）とプライマー伸長の生成物（レーン 2）をポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。S1 マッピングに用いたプローブの大きさと両実験における生成物を k b で左に示す。O s P S K の c D N A の 5' 末端に相当する、32 塩基長のオリゴデオキシリボヌクレオチドのうち一つをプライマーとして用いて（図 4）、プライマー伸長反応を行った。O c 培養細胞より抽出された全 R N A を鋳型として用いて、ポリアクリルアミドゲル中の電気泳動後のオートラジオグラフィーにより生成物を解析した。長さが約 162 塩基である一つのバンドが、伸長生成物より検出された（図 3）。次に、O s P S K 遺伝子に由来する 3.6 k b の E c o R I 断片を用いて 315 b p のプローブ及び³²P でラベルしたプライマーを作製し、次いで P s t I 分解を行った。その後³²P でラベルした 315 b p の断片をプローブとして S1 ヌクレアーゼ解析を行った。プローブを全 R N A とハイブリダイゼーションしてから S1 ヌクレアーゼで分解した後に、162 塩基の生成物が再び検出された（図 3）。この大きさは、5' 末端残基からプライマーに対して相補的な位置までの大きさと同一であった。そのために、T A T A b o x の下流 62 塩基に位置する、O s P S K の c D N A の最初のグアニジンを +1 とした。そしてそのグアニジンは、O s P S K 転写産物の 5' 末端であると思われた（図 4）。

【0030】

(O s P S K 遺伝子のゲノム構成)

ゲノミッククローン λ E M B L 3 / 7-1 において、全 O s P S K 遺伝子に対応している 7.4 b p 領域の核酸配列につき、両鎖の配列を完全に決定してその

構造を解析した。図4に、OsPSK遺伝子の塩基配列と、推定アミノ酸配列を示す。図4において、転写開始点を+1で示し、TATA boxを四角で囲った。CAAT box、3つのE box、3つのCCAAT box、エンハンサーコア様配列、3つのSSREを下線で示した。制御的な核蛋白質であるSEF3の結合部位を配列の上の縞模様の線で、ポリアデニレーションシグナルを、二重下線で示した。プライマー伸長及びS1マッピングに用いたプライマーに相補的な配列を点線で示す。矢印は、種々のOsPSK-イントロン-GUS融合プラスミドの構築に用いた部位を示す。アミノ酸配列は一文字表記で示し、PSK- α のアミノ酸配列は太文字で、翻訳終止コドンに星印で示す。この断片とcDNAの配列を比較すると、OsPSK遺伝子は2つのエクソン(245bpと463bp)により構成されていることが判明した。それらの2つのエクソンは、cDNA配列と完全に一致し、1150bpの大きなイントロンが挿入されていた。そのイントロンには、高度に保存されたGT-AGイントロンボーダー配列が認められた。フレーム内のTGA終止コドンは、最初のエクソンのメチオニンコドンの337bp上流に見出された。最初のエクソンは5' 非コード領域及びPP-PSK (preprophyto sulfokine) の約半分に相当するコード領域を含んでいた。PP-PSKの約半分に相当するコード領域とは、開始メチオニンを含む、前駆体89アミノ酸残基中の48アミノ酸残基である。22アミノ酸のアミノ末端疎水性領域が最初のエクソン中に見出され、その領域はシグナルとして作用すると考えられる。第二のエクソンは3' 非コード領域及びPP-PSKの残りの41アミノ酸のコード領域より成り、その41アミノ酸中にはPSK- α 配列が一度だけ見られ、カルボキシ末端で終了している。AATTAの配列から成るポリアデニル化シグナルが、1629から1635において見られる。

【0031】

(OsPSK遺伝子の5' 上流領域の特性)

OsPSK遺伝子の5' 上流領域が、他の遺伝子の何らかの既知のモチーフ又は制御領域を有しているか、検索を行った。その結果、5' 上流領域には、制御領域である可能性がある因子がいくつか含まれている事が示された(図4)。T

ATA box (5'-TATAA-3') であろうと思われるコンセンサス配列が-63 から-68 の位置に見出され、それは転写開始部位を示している。この配列の上流に、-267 から-270 の位置に一つのCAAT boxがあり、そして-906 から-910、-949 から-953 および-1074 から-1078 の位置に、3つのCCAAT boxがあった。興味深い事に、AACCCA (-908において) 配列は、A (A/C/G) CCAコンセンサス配列に一致した。そのコンセンサス配列は、制御的な核蛋白質SEF3に対するダイズエンハンサーの結合部位である (Allen et al., 1989)。また、8-ヌクレオチドエンハンサーコア様モチーフが、5'-GTGGAAAG-3' の配列でもって-1105 から-1112 の位置に存在していた。加えて、3つのE box (コンセンサス配列: 5'-CANNTG-3': Pabo, 1992)、3つの剪断応力反応因子 (SSRE: 5'-GAGACC-3': Resnick et al., 1993)、およびいくつかの繰り返し配列が、5' 末端領域にあった。これらの発見は、転写が種々の遺伝因子により影響されていることを示している。

【0032】

(形質転換細胞内におけるOsPSK::GUSキメラ遺伝子の発現)

OsPSK配列の発現に必要な5' 上流配列を決定するために、pIG121プラスミド中のCaMV35Sプロモーターを、OsPSK遺伝子の5' 領域に由来する種々の断片に置き換えた。図5に、OsPSK-イントロン-GUSコンストラクトの構造を示す。図5において、一番上の図がOsPSKの5' 上流領域の模式図であり、制御因子の位置を示す。その下に、GUS遺伝子(白抜き)と融合した、種々の領域の5' 上流配列(太線)を含むコンストラクトと、各コンストラクトの名前を示す。制限酵素部位の略称は図2と同様である。BSSEF3は、制御的な核蛋白質であるSEF3がダイズエンハンサーに結合する部位であり、ECSはエンハンサーコア配列であり、SSREは剪断応力反応因子である。点線は、逆方向に挿入した断片を示す。陽性コントロールとして、CaMV35Sプロモーターを含む、元のpIG121を用いた (Ohta et al., 1990)。アグロバクテリウムの感染により、これらのコンストラクトをOc懸濁細胞中へ導入し、形質転換した細胞を、50 mg/Lのカナマイシンを添加したMS寒

天培地上で選抜した (Yang et al., 1999)。それぞれのコンストラクトに対して、5つ以上の独立した形質転換クローンにつき、GUSアッセイを行った (Jefferson et al., 1987)。これらのアッセイの結果を図6に示す。GUS活性は、3回実験を行った平均値と標準偏差で示す。

【0033】

pIG121-1、pIG121-2、pIG121-3、pIG121-4、pIG121-6の、5つのOsPSK-イントロン-GUSプラスミドを構築し、最大のGUS活性に必要とされる、OsPSKの5'上流配列の最短の長さを決定した。これらのプラスミドを有する形質転換細胞は、全てGUS活性を示した。陰性コントロールである非形質転換細胞では、GUS活性の発現を検出できなかった。OsPSK遺伝子の、最も短い5'上流領域を有するpIG121-1プラスミドは、TATA box以外には制御領域と思われる因子を有しておらず、GUS活性が最も低かった。最大のGUS活性は、pIG121-4プラスミドにおいて発現した。pIG121-4の中には、SSREを含む5'の推定制御因子の殆どとエンハンサーコアモチーフが存在している。それは、OsPSK転写開始部位の1.9 kb上流領域は、形質転換したOc細胞において最大のGUS活性を示すのに必要な、最小部分であることを示している。最長のOsPSKの5'領域を有するpIG121-6により形質転換した細胞は、pIG121-4により形質転換した細胞と同程度のGUS活性を示した。

【0034】

pIG121-3ではなく、pIG121-4内のOsPSK 5'上流領域のBglII-HindIII断片中において、エンハンサー様活性を有する可能性を試験するために、pIG121-4とは反対の方向でBglII-HindIII断片を含んでいる、pIG121-5プラスミドを構築した。このコンストラクトにより形質転換した細胞のGUS活性は、pIG121-4で形質転換した細胞と比較して、顕著に活性が低下していた (図6)。pIG121-6中の2.3 kbのEcoRI-HindIII断片を、pIG121-3中に逆向きに挿入したpIG121-7もまた構築した。pIG121-7プラスミドは、pIG121-3およびpIG121-5と同等のGUS活性を示した。これ

らの結果は、エンハンサー因子が最大のGUS活性の発現に関与しており、その促進が方向に依存している可能性を示唆している。

【0035】

O s P S K 5' 上流領域の制御下にあるGUSレポーター遺伝子のGUS活性は、形質転換したOc細胞中のCaMV35Sプロモーターにより制御されるGUS遺伝子より得られる活性より約2倍から5倍高かった。それは、その領域が、形質転換したイネOc培養細胞中において、外来遺伝子の構成的な発現を制御するのに十分なプロモーターを含んでいる事を示している。

【0036】

(外来性オーキシン及びサイトカイニンの影響)

形質転換したOc細胞において外来性のファイトホルモンが、O s P S K::GUS遺伝子の発現にどの様に作用するかを調べるために、RNAプロット解析を行った。外来性オーキシン(1mg/Lの2, 4-D)及び/又はサイトカイニン(1mg/Lの6-BA)をMS培地に添加して、pIG121-4プラスミドにより形質転換したOc細胞を処理した。種々のサンプルから全RNAを単離し、ノザンプロット解析を行った。図7に、pIG121-4を導入した形質転換Oc細胞における、外来性オーキシン及びサイトカイニンによるO s P S Kプロモーターの制御を示す。図7において、定常状態のgusA mRNAレベルをノザンプロットティングにより検出し(左側)、リボゾーマルRNAをエチジウムブロマイド染色により検出した(右側)。形質転換したOc細胞をオーキシン及び/又はサイトカイニンによる処理後0時間後(レーン0)、12時間後(レーン1)、24時間後(レーン2)、48時間後(レーン3)、72時間後(レーン4)に回収した。図7は、全RNAをそれぞれのサンプルから抽出し、GUSコード領域を含むpIG121の、放射ラベル化したXbaI-SacI断片とハイブリダイゼーションを行った結果である。図7Aは2mg/Lの2, 4-DをMS培地に添加した結果であり、2, 4-D処理を開始した後12時間後に、GUSのmRNAレベルは顕著に増加し、48時間で最大レベルに達した(図7A)。図7Bは2mg/Lの6-BAをMS培地に添加した結果であり、O s P S K::GUS遺伝子の発現は、6-BAで24時間処理した後でも増強された

が、48時間後にGUS転写産物の減少が明らかに観察された(図7B)。図7Cは1mg/Lの2,4-Dと1mg/Lの6-BAをMS培地に添加した結果であり、6-BAと組み合わせて2,4-Dによる処理を行うと、処理を行っている間を通じて、mRNAレベルの持続的な増加が引き起こされるという結果となった(図7C)。これらの結果は、外来性のオーキシン及び外来性のサイトカイニンの両者が、Oc培養細胞中においてOsPSKの発現を増強する可能性を示唆している。

【0037】

本発明者らは、イネOc培養細胞から、OsPSKのcDNAの単離を行っている(Yang et al.,1999)。機能獲得及び機能欠損の研究より、OsPSKのcDNAは、植物より同定されたペプチド性増殖因子であるPSK- α の前駆体をコードしていることを証明した。本発明において、イネのOsPSK遺伝子を同定し、特性解析を行った。サザンブロット解析より、OsPSKは単一コピーの遺伝子であることがわかった(図1)。単離されたOsPSK遺伝子は、cDNAに相同する2つのエキソン、及び大きなイントロンより成る(図2)。そのイントロンは、保存されたGT-AGイントロンボーダー配列を有している。最初のエキソンは、5'非コード領域及び、PP-PSK(preprophyto sulfokine)の約半分に当たるコード領域から成り、そのコード領域はシグナルペプチド(Von Heijne,1986)として作用すると思われる22アミノ酸残基を含む、疎水性アミノ末端領域を有している。分泌経路に沿って蛋白質を保持させる基となるであろうシグナル(Nakai and Kanehisa,1992)が、PP-PSKの配列中において検出されなかった。それは、この蛋白質が細胞外蛋白質であり、活性型のPSK- α がレセプターのリガンドとして作用するかもしれない可能性を示唆している。第二のエキソンは3'非コード領域及びコード領域から成り、そのコード領域中にはPSK- α の5つのアミノ酸配列が1回あり、カルボキシ末端で終結している。

【0038】

イネOc細胞は、1mg/Lの2,4-Dを添加したMS培地上又はMS培地中において、簡単に維持が可能であり、通常は2週間の間隔で希釈する。過去に

において、P S K- α の合成及び生理学的機能の解析において、イネO c細胞が優れた素材であることを、本発明者らは示してきた (Yang et al.,1999;Yang et al.,2000)。本研究において、O s P S K遺伝子の5' 上流領域とイントロン-G U Sレポーター遺伝子 (Ohta et al.,1990)とを融合させたプラスミドを構築した。そのイントロン-G U Sレポーター遺伝子は、G U Sをコードする配列のアミノ末端部分に、トウゴマカタラーゼ遺伝子の修飾されたイントロンを含んでいた。C a M V 3 5 Sプロモーターの制御下に置いたとき、イントロン-G U Sレポーター遺伝子は、G U S活性を示した。そのG U S活性の程度とパターンは、アグロバクテリウム細胞ではなく、タバコ細胞においてG U S活性につき元来得られたのと同様であった (Ohta et al.,1990)。更に、イントロンによりG U S合成を刺激する顕著な効果が、イネ細胞において認められており (Tanaka et al.,1991)、それはイントロン-G U Sレポーター遺伝子はイネ細胞において外来遺伝子の発現を検出するのに有用であることを示している。O s P S K遺伝子の種々の長さの5' 上流領域を融合することにより、最大のG U S活性発現に必要な、最小のO s P S K 5' 上流配列は、転写開始点から1.9 k b上流に見出された (図3)。この領域は、形質転換したO c細胞においては、C a M V 3 5 Sプロモーターと比較して約5倍活性が高く、その領域は形質転換したO c培養細胞において外来遺伝子の構成的な発現を制御できる、効果的なプロモーターを含んでいることを示唆している。

【0039】

O s P S K遺伝子の5' 上流領域中において、制御因子である既知のモチーフがいくつか見出された (図3)。O s P S Kプロモーターの最も顕著な特徴は、C C A A T b o xが3つ存在していることである。C C A A T b o xは、C C A A T b o x/エンハンサー結合蛋白質が結合する標的である (Ryden and Beeemon,1989)。更に、3つのS S R EがO s P S Kの5' 上流領域に見出された。S S R Eは、内皮細胞において発現している、ヒト遺伝子のいくつかのプロモーター中に存在するシス作動性の要素であり、その様な遺伝子には血小板由来成長因子 β 鎖、及び形質転換成長因子 β 1 (Resnick et al.,1993)がある。このS S R EはDNA結合蛋白質と相互作用し、剪断応力反応性に必要である。こ

これらの制御因子を含んでいる領域を欠損することにより、GUSの発現が低下する、という結果（図6）となった。これは、それらの因子が実際にOsPSKの発現に関与しているかもしれない、ということを示唆している。加えて、3つのEboxがOsPSKの5'末端領域に位置している。Eboxは、コンセンサス配列である5'-CANNTG-3'を有しており、あるクラスの転写因子の認識部位であると知られているが、制御機能を発揮するためにホモ及びヘテロダイマーを形成することができる（Li and Capetanaki, 1994）。Gbox（5'-CACGTG-3'）因子はシス作動性配列のファミリーを構成しており、シス作動性配列のファミリーは、動物のみならず植物の種々の因子の反応において遺伝子発現の制御に関与していることが示されてきている（Baker et al., 1997; Dolferus et al., 1994）。PSK- α は、夜間に高温の条件下において、シロイヌナズナの成長を促進し、苗のクロロフィル含量を増加する（Yamakawa et al., 1999）。それは、PSK- α 前駆体遺伝子において保存されているEboxは、周囲の環境ストレスに反応する制御機能を有している可能性を示唆している。

【0040】

8-ヌクレオチドエンハンサーコア様モチーフであるGTGGAAAGが、OsPSKの5'上流領域（図3）に存在している。そのエンハンサーコア様配列は、既知のウイルスエンハンサーの間において最も共通した配列であり、特定の遺伝子の転写活性を劇的に増加させる（Weiher et al., 1983）。エンハンサーコア様配列は、ヒトオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子の5'上流領域にもまた存在している（Hata et al., 1987）。これらの発見は、そのエンハンサー配列は、ウイルスから真核生物まで共通して保存されていることを示している。エンハンサーコア様モチーフを含む、OsPSK遺伝子の1.9 kbの5'上流領域は、最大レベルのGUS発現に必要でありかつ有効であった。そしてこの領域は、形質転換したOc細胞（図5）中で、CaMV35Sプロモーターと比べても、より高い活性を示した。OsPSK遺伝子中におけるエンハンサーコア様モチーフは、OsPSK::GUS遺伝子の高レベルの発現において、何らかの機能的役割を有している可能性が考えられ、この促進作用は、遺伝子の導入方向に依存していた。

【 0 0 4 1 】

培地中に外植されたとき多くの植物組織は脱分化し、分裂を回復して増殖するカルスを形成する。細胞分裂の誘導及び引き続いてのカルス形成は通常、オーキシン及びサイトカイニンの両者が同時に存在することを必要とする。それ故に細胞増殖は、オーキシン及びサイトカイニンに対する直接的な反応かもしれず、又は一定のレベルに達したPSK- α により、オーキシン及びサイトカイニンの制御下において引き起こされた間接的な反応である可能性もある。懸濁液中で培養したアスパラガスの葉肉細胞中において、1-ナフタレン酢酸及び6-BAの両者が存在しているときにだけ、PSK- α が生成した。これらの植物ホルモンのいずれか培地より除かれたら、PSK- α の明確な生産は認められなかった。それは、PSK- α の生産には、オーキシン及びサイトカイニンの両者が通常必要であることを示している(Matsubayashi et al., 1999a)。本発明において、外来のオーキシン及び外来のサイトカイニンの両者が、形質転換したOc細胞において、OsPSK::GUS遺伝子の発現を増強することを示した(図7)。外来ホルモンは、内在性のホルモンレベルの調節を反映しないかもしれないから、外来ホルモンとの関わりについては、更なる検討が必要である。

【 0 0 4 2 】

(参考文献)

- (1) Akama, K., Shiraishi, H., Ohta, S., Nakamura, K., Okada, K. and Shimura, Y. 1992. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotype and *Agrobacterium* strains. *Plant Cell Rep.* 12: 7-11.
- (2) Allen, R.D., Bernier, F., Lessard, P. and Beachy, R.N. 1989. Nuclear factors interact with a soybean b-conglycinin enhancer. *Plant Cell* 1: 623-631.
- (3) Baba, A., Hasezawa, S. and Syono, K. 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* 27: 463-471.
- (4) Baker, S.S., Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. 1994. The 5'-region o

f *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* 24: 701-713.

(5) Bisseling, T. 1999. The role of plant peptides in intercellular signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 365-368.

(6) Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

(7) Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15: 532-536.

(8) Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* 105: 1075-1087.

(9) Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. and Meyerowitz, E.M. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.

(10) Franssen, H.J. 1998. Plants embrace a stepchild: the discovery of peptide growth regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 384-387.

(11) Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kamada, H. and Sakagami, Y. 2000a. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol.* 41: 27-32.

(12) Hanai, H., Nakayama, D., Yang, H., Matsubayashi, Y., Hirota, Y. and Sakagami, Y. 2000b. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine O-sulfation of preprophytosulfokine variants in vitro. *FEBS Lett.* 470: 97-101.

(13) Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M. and Matsuda I 1986. Isolation and characterization of the human ornithine transcarbamylase

- se gene: structure of the 5'-end region. *J. Biochem.* 100 :717-725.
- (14) Huttner, W.B. 1984. Determination and occurrence of tyrosine O-Sulfate in protein. *Meth. Enzymol.* 107: 200-223.
- (15) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- (16) Jung, L.J. and Scheller, R.H. 1991. Peptide processing and targeting in the neuronal secretory pathway. *Science* 251: 1330-1335.
- (17) Kobayashi, T., Eun, C.-H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Kamada, H. 1999. Phytosulfokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates cell division that leads to somatic embryogenesis in carrot. *J. Exp. Bot.* 50: 1123-1128.
- (18) Li, H. and Capetanaki, Y. 1994. An E box in the design promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription. *EMBO J.* 13: 3580-3589.
- (19) McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M. and Ryan, C.A. 1992. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255: 1570-1573.
- (20) Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. 1996. Phytosulfokine, sulfated peptides that induced the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7623-7627.
- (21) Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. and Sakagami, Y. 1996. Active fragments and analogs of the plant growth factor, Phytosulfokine: structure-activity relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 209-214.
- (22) Matsubayashi, Y., Takagi, L., and Sakagami, Y. 1997. Phytosulfokine-a, a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13357-13362.

- (23) Matsubayashi, Y., Morita, A., Matsunaga, E., Furuya, A., Hanai, N. and Sakagami, Y. 1999a. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine-a, in stimulation of a sparagus cell proliferation. *Planta* 207: 559-565.
- (24) Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A. and Sakagami, Y. 1999b. The endogenous sulfated pentapeptide, phytosulfokine-a, stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 120: 1043-1048.
- (25) Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. 1999. Characterization of specific binding sites for an endogenous sulfated pentapeptide, phytosulfokine-a, in the plasma membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. *Eur. J. Biochem.* 262: 666-671.
- (26) Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- (27) Murry, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.
- (28) Nakai, K. and Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911.
- (29) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. 1990. Construction and expression in tobacco of a b-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.
- (30) Pabo, C.O. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.
- (31) Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bomthron, D.T., Dewey, C.F. Jr. and Gimbrone, M.R. Jr. 1993. Platelet-derived growth factor b chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4591-4595.
- (32) Ryden, T.A. and Beemon, K. 1989. Avian retroviral long terminal rep

eats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 9: 1155-1164.

(33) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

(34) Schaller, A. 1999. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 40: 763-769.

(35) Tanaka, A., Mita, S., Ohta, S., Kyojima, J., Shimamoto, K. and Nakamura, K. 1991. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucl. Acids Res.* 18: 6767-6770.

(36) von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* 14: 4683-4690.

(37) Weither, H., Konig, M. and Gruss, P. 1983. Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. *Science* 219: 626-631.

(38) Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H. and Satoh, S. 1999. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-a, on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 2240-2243.

(39) Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. 1999. *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine-a, a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13560-13565.

(40) Yang, H., Morita, A., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. 2000a. Rapid and efficient *Agrobacterium* infection-mediated transient gene expression in rice *Oc* cells and its application for expression and antisense suppression of *OsPSK* cDNA for a precursor to phytosulfokine-a

, a peptide plant growth factor. Plant Cell Physiol. 41: (in press)

(41) Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H. and Sakagami, Y. 2000b. Phytosulfokine-a, a peptide growth factors found in higher plant: its structure, functions, precursor and receptors. Plant Cell Physiol. 41: (in press)

【 0 0 4 3 】

【配列表】

< 1 1 0 > 出願人氏名：名古屋大学長

< 1 2 0 > 発明の名称：ファイトスルフォカイン前駆体遺伝子のプロモーター

< 1 6 0 > 配列の数：5

< 2 1 0 > 配列番号：1

< 2 1 1 > 配列の長さ：3 3 5 9

< 2 1 2 > 配列の型：核酸

< 2 1 3 > 起源：イネ O c 細胞

< 4 0 0 > 配列

-3359

```

GAATTCCTGG TTTAGTTTTTC TATTAGTTGG GCACAAGATC ATAAGTGCAG TATTGTATTT -3300
AAGATTCAAC ACAGGTTCAA TTTGTCACAC CCTGTAATTT GGCATCTACA ATCTGAAAAAT -3240
GAATGGCTAA TCAAAAAGGCT CTGAGCACAC AAATGGCTAA TTTCTTCCAT CTAGTTGAGA -3180
AACCTTTCAA TTATACAAAT GGAAAAGATA TGGATGTGAT TTGTGGGCTG AAAACCCTTT -3120
GATAATCAAC AATTGTTAGT GCCTTCAACT TTCAATGCAC CCATGTTTTTC TTGTTACGTT -3060
TGCAAGATCA AAACAATGTT GGAAACGTCA TCTCGCCAGG TAAAGCAATG AATGACGACA -3000
ATTAAGAAGA TTTTGTCTCC TGAAGACTAC TAATGATGGA TATTAAGGGT ATAATAACCT -2940
ATCCAGGATT GTGATGTTCA ATCCCCTTGT AGCATACCTG ATAAGTGTGG TGAGTTAAAA -2880
GCAGTCCCAT TTACAAAAAG AAAAAGGAAG GCCCATATCT AGCAAAAAAA ATAGACTGCA -2820
TACGTATAGT TGTTTGTGAA AAAGTTCAAG ATGCATACAA GCCGCAGTTT TCTTCAGATA -2760
GTGTGGCATC TTCTTACTTC AAGGAAAAAA ACATTATGCT AGTTTGGAAA TAACTTCAAA -2700
TTTGTCCCTG TGATGGAAAT TAAACCATTG GTAAGTAGTC TAGCAATATC AAACCTAAGG -2640
TGTGTGTTGC ATATGAATTA GGAAAAACCA TGTCAAACCA ACTGAAACCA AGGAAAAATCC -2580
ACCATACTAA CATACTTAAA TACCTTGAGG TGAGAAACAT ATAAAGCATA CAGAGAACAT -2520
GATTAGTAAG AATGACGAAG ATAAAATACA CTAAGGTAAT TAGGGAAAAAC AGCAAAGTTC -2460
ATTTGGACAT TTGATATCAT GGAAAGCTAT AGAAAAATGT GTACCTTACA GACCGAAATG -2400
GAAAGAGTCC ACGATAAAAA GTCATTTTTG CACCATTTTC CATTGTAATA CTTATCGAGA -2340
CAAATTTATG CGCGCACCTT TTTTCCCCCA TCCATCCAAA TAAATTTTTA TTGGTAAAAAC -2280

```

TTGTTGCTTT ATGACAGCAG GAAGTATCTT TTACAATCTA ATGTACCCAT CAGTACAATA -2220
 TTCTAGTAGT ATATCTACAA CAAAAATAAA GATCAAGGGC ATGCTTGGCA CATAGAATTT -2160
 TGTATGGAAT TAGTTCAAGT CATTGTGTTA GCACATAAAT TTGGCAAAAC TCTCATCTTC -2100
 CAAATTAACC TTGCAAAATT TAACCAAGAA AAACATATA CTATCATCCC GTTCCATGTC -2040
 CTCCTAGTA GCAAACTTTT TATGCAACCA TTTTTTTTTC TCGACAGGGC ATTATTCGTG -1980
 GTTACTGTGT GCATTAATAG CATTAATAAC AGCTAGCATG TGAGCCTGTT ATTAGGGGTA -1920
 GGCAGAAAGA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCCGTCC -1860
 TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGTT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
 TAGACGAAAG ACCAAATTAA CAAAAAAAAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
 CAATATAATT AAACCTAAT TTTACAGCC CTACTTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
 AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTTG TTTTGTGATT TTTGTGTAA AAATTTCCAT -1620
 TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTTCCGTC AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
 TTTGTCGGTC ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
 CGAATATTTT GGTGAGACCG AATGCCCACC CCTACTTGTT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
 ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTTT TAAACTATGA GGCACCTCCT TTTAATGAA -1380
 AAATCAAACG CGATAACTTT TAATTAAGAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
 GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
 AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
 CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
 CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCCACAATG -1080
 TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
 TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
 GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
 CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
 GGTCAACTTC ATTAAATTTT TCCCTTGGTA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
 TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
 TTCCCGATT CCGTGTAAT AAACACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
 TTTTGTATG GGCCAAAAC TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTAA -600
 GAAAACCTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGGTTT -540

GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTCGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
 TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
 CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
 CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
 TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
 ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
 TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
 ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
 GTTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA -1

< 2 1 0 > 配列番号 : 2

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 9 1 1

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : イネ O c 細胞

< 4 0 0 > 配列

```

-1911  GA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCGGTCC -1860
TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGTT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
TAGACGAAAAG ACCAAATTAA CAAAAAAAAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
CAATATAATT AAACCTAAT TTTACAGCC CTAATTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTTG TTTTGTGATT TTTGTGTAA AAATTTCCAT -1620
TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTCGGTC AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
TTTGTGGTTC ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
CGAATATTTT GGTGAGACCG AATGCCACC CCTACTTGT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTT TAACTATGA GGCACCTCCT TTTAATGAA -1380
AAATCAAACG CGATAACTTT TAATTAATAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCCACAATG -1080
TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
TAAACACACA CTTGACACT TGAATTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
GGTCAACTTC ATTAATTTT TCCCTTGGTA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
TGCAAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
TTCCCGATT CCGTGTAAT AAACACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
TTTTGTTATG GGCCAAACT TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTTA -600
GAAAACTTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTT -540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480

```


TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
 CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTITTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
 CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
 TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
 ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
 TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
 ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
 GTTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA -1

< 2 1 0 > 配列番号 : 3

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 0 3 4

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : イネ O c 細胞

< 4 0 0 > 配列

-1034	AGCTT GTGCATGGCC	-1020
TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA		-960
GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC		-900
CATTGACTTC AATTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG		-840
GGTCAACTTC ATTAATTTTC TCCCTTGGA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG		-780
TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC		-720
TTCCCGATTC CCGTGTAAT AACTACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA		-660
TTTTGTTATG GGCCAAACT TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTTA		-600
GAAAACTTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT		-540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGCAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC		-480
TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTAC AACATTAATA		-420
CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT		-360
CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA		-300
TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG		-240
ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG		-180
TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT		-120
ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT		-60
GTTCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA		-1

< 2 1 0 > 配列番号 : 4

< 2 1 1 > 配列の長さ : 5 6 3

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : イネ O c 細胞

< 4 0 0 > 配列

-563	ATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT	-540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC		-480
TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA		-420
CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT		-360
CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA		-300
TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG		-240
ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG		-180
TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT		-120
ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT		-60
GTTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA		-1

< 2 1 0 > 配列番号 : 5

< 2 1 1 > 配列の長さ : 5 3 9 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : イネ O c 細胞

< 4 0 0 > 配列

-3359

GAATTCCTGG TTTAGTTTTC TATTAGTTGG GCACAAGATC ATAAGTGCAG TATTGTATTT -3300
 AAGATTCAAC ACAGGTTCAA TTTGTCACAC CCTGTAATTT GGCATCTACA ATCTGAAAAT -3240
 GAATGGCTAA TCAAAAAGGCT CTGAGCACAC AAATGGCTAA TTTCTTCCAT CTAGTTGAGA -3180
 AACCTTTCAA TTATACAAAT GGAAAAGATA TGGATGTGAT TTGTGGGCTG AAAACCCTTT -3120
 GATAATCAAC AATTGTTAGT GCCTTCAACT TTCAATGCAC CCATGTTTTTC TTGTTACGTT -3060
 TGCAAGATCA AAACAATGTT GGAAACGTCA TCTCGCCAGG TAAAGCAATG AATGACGACA -3000
 ATTAAGAAGA TTTTGTCTCC TGAAGACTAC TAATGATGGA TATTAAGGGT ATAATAACCT -2940
 ATCCAGGATT GTGATGTTCA ATCCCCTTGT AGCATACCTG ATAAGTGTGG TGAGTTAAAA -2880
 GCAGTCCCAT TTACAAAAAG AAAAAGGAAG GCCCATATCT AGCAAAAAAA ATAGACTGCA -2820
 TACGTATAGT TGTTTGTGAA AAAGTTCAAG ATGCATACAA GCCGCAGTTT TCTTCAGATA -2760
 GTGTGGCATC TTCTTACTTC AAGGAAAAAA ACATTATGCT AGTTTGGAAG TAACTTCAAA -2700
 TTTGTCCCTG TGATGGAAAT TAAACCATTG GTAAGTAGTC TAGCAATATC AAACTTAAGG -2640
 TGTGTGTTGC ATATGAATTA GGAAAAACCA TGTCAAACCA ACTGAAACCA AGGAAAAATCC -2580
 ACCATACTAA CATACTTAAA TACCTTGAGG TGAGAAACAT ATAAAGCATA CAGAGAACAT -2520
 GATTAGTAAG AATGACGAAG ATAAAATACA CTAAGGTAAT TAGGGAAAAAC AGCAAAGTTC -2460
 ATTTGGACAT TTGATATCAT GGAAAGCTAT AGAAAAATGT GTACCTTACA GACCGAAATG -2400
 GAAAGAGTCC ACGATAAAAA GTCATTTTTG CACCATTTTC CATTGTAATA CTTATCGAGA -2340
 CAAATTTATG CGCGCACCTT TTTTCCCCCA TCCATCCAAA TAAATTTTTA TTGGTAAAAC -2280
 TTGTTGCTTT ATGACAGCAG GAAGTATCTT TTACAATCTA ATGTACCCAT CAGTACAATA -2220
 TTCTAGTAGT ATATCTACAA CAAAAATAAA GATCAAGGGC ATGCTTGGCA CATAGAATTT -2160
 TGTATGGAAT TAGTTCAAGT CATTTGTAA GCACATAAAT TTGGCAAAAC TCTCATCTTC -2100
 CAAATTAACC TTGCAAAATT TAACCAAGAA AACTATATA CTATCATCCC GTTCCATGTC -2040
 CTTCTAGTA GCAAACTTTT TATGCAACCA TTTTTTTTTT TCGACAGGGC ATTATTCGTG -1980

GTTACTGTGT GCATTAATAG CATTAATAAC AGCTAGCATG TGAGCCTGTT ATTAGGGGTA -1920
 GGCAGAAAAGA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCGGTCC -1860
 TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGTT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
 TAGACGAAAG ACCAAATTAA CAAAAAAAAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
 CAATATAATT AAACCTAAT TTTACAGCC CTAATTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
 AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTG TTTTGTGATT TTTGTGTAA AAATTTCCAT -1620
 TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTTCCGTC AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
 TTTGTCGGTC ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
 CGAATATTTT GGTCAGACCG AATGCCACC CCTACTTGTT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
 ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTTT TAACTATGA GGCACCTCCT TTTAATGAA -1380
 AAATCAAACCT CGATAACTTT TAATTAATAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
 GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
 AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
 CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
 CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCACAATG -1080
 TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
 TAAACACACA CTTTGACACT TGAATTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
 GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
 CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
 GGTCAACTTC ATTAAATTTT TCCCTTGGA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
 TGCAAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
 TTCCCGATT CCGTGTAAT AAACACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
 TTTTGTTATG GGCCAAAACCT TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTTA -600
 GAAAACCTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT -540
 GGTAAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
 TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
 CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
 CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
 TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240

ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
 TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
 ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
 GTTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAAG 1
 AAGAAGCAGC AGCAAAAAAG TTGATCAGTT AATTAGCAAG TGTGTTCTTC TTTCTTTTGG 61
 TGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGATCTCAGA ATGGTGAATC CAGGAAGAAC 121
 AGCTAGGGCA CTCTGCCTCC TATGCCTTGC TCTCCTCCTG CTAGGTCAAG ATACCCATTC 181
 CAGGAAGCTC CTGTTGCAGG AGAAGCACAG CCATGGCGTC GGCAACGGCA CAACCACCAC 241
 CCAGGTCAGC AGAATTAGTT CAGTATCGTT TCTTCAGCTT ATTAACCGTG GCCAAATTTG 301
 AATTCTATAA CTTAATTTTA GAGTTGATGT GGATGTGTTA TTAATCATAG ATTATTTCTC 361
 AACATTGGGT TTTATGCCGC TAATAACACA TATGTA AAC CTTTACAAAC AAATTATTTT 421
 TCGGTCGCTA ATAAGCGTTA CGGCTTATAA TTTTCCTAGT GAACAGTGCA TGCATTTTGC 481
 AAACCTTCTTG TTGGCTCTGG TTGCAACTTG CAAGCACGCA TATGCATTGA GAGAAGAGTT 541
 CATACACACA CTGTATTATA TATATGTACA TTTGGGGTAT AAGATACTAA AATGAAACAG 601
 GAGCATCGTG TTCTGAAATG GCGTGGCGTT CTGTTTATT TTCAGCTTGT GTAATTGCTG 661
 GAGGGCAATA GCATGGGAAA ACACTCTAAT CTGAATCTGT GACACCTGGA ACAGTAGCAC 721
 CATTCTTGAT GGCATAATCA TGTCTTAACC ACATGTCTAT CGTTGGAATC CTGGTACAAT 781
 GCTCCGAGCT GCATCGATCC ATCCATGCAT GTTACCTCCA TGTGTTTCGAA GATGCTATAT 841
 ATTTGCATAC GACAGGCACA GCTTCATGAA TGTACTTCGG CACTGTCTTA CCAAACCTCCC 901
 CTCCGTTTCA TATTATAAGT CATTTGATTT TTTTTTCCTA GTCAAGTATG ACCAAGCTTA 961
 TAGAAAAAAT TAGAAACATC TAAAATAACA AACTAGTTTC AGAAAAATCTA ACATTGAATA 1021
 TATTTTGATA ATATATTTGT TTTGGGTTGA AAATACTAGT ATATTTTTC AATAACTTGG 1081
 TCCAACCTAA CTAGAAAAAA AATCAAACGA CTTATAATAT GAAACGGAGG GAGAACTTTC 1141
 GTTTTGATTT TCCAAAGAAC GACATTATCT TAATTTTAAG ACATCGTTAT TGTTTTTAAA 1201
 ATAATAATAG GATCACTAGT TTCTATTACA ATATATTTGT AAAACACAAT AATATGACAA 1261
 TATTATAGAG GTAGTACTAC TTTTGTATAT TTCCATACAC CCAATCTATA AATTGATCAA 1321
 AGTTTCTGCT TCCACTCTGT TTCGTTTCGT CTTGAAAGTT TTCTTCTAAC AGTATGATGA 1381
 TCTTGATCAA TCAGGAACCA AGCAGAGAGA ATGGAGGAAG TACAGGTTCC AATAACAATG 1441
 GGCAGCTGCA GTTTGATTCA GCCAAATGGG AAGAATTCCA CACGGATTAT ATCTACACCC 1501

AAGATGTCAA AAACCCATAA TGGCTGTTCA TTTATGATTT GAACTAGTAC TAGTAGCTTA 1561
 TACCTTCTGC GCGTCTTTTG TTCGTTTGGA GAGGGGATTT TCTTGGGATT TAGCATATGA 1621
 ACTAATTAAA TTAAATCCCA GGCAAATCCC ACTCAGCCCA TTTTGTGCAG AAGTTGTCAG 1681
 TGTGCACTGT ATAATTATTT AGTCATACAC AACTACTCCT GGTAACACT CCTATCTTCG 1741
 ATGAATTTTC TGGTTTTGCC AGACGTGACA ATAGTCCAGT AGCATGCAGT ACCCTCTCAG 1801
 AATCCCTGTA ATTTTITAGCA AAAAAAAAAAG GAAGAAAAGA AAAGAAGCTT CCCTACTTTC 1861
 TCCGTTTCAC AATGTAAGTC ATTCTAGCAT TTTCTACATT CATATTGATG TTAATGAATC 1921
 TGGATAGATA TATACTCCCT CCGTCGAAAA AAAAAAAGGC AAACGTGGG TTCCGTGCTA 1981
 ACGTTTGACT GTCCGCTTAT ATGAAATTTT TTTATAATTA GGATTTTCAT TG 2033

【発明の効果】

本発明により、イネのファイトスルフォカイン前駆体遺伝子に由来する、新規なプロモーターが与えられた。本発明のプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーター以上のプロモーター活性を有する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、OsPSK の cDNA をプローブとして、イネ Oc 細胞のゲノム DNA について、プロッティングで解析を行った結果を示す写真である。

【図 2】 図 2 は、OsPSK 遺伝子のゲノム遺伝子の制限酵素地図及び OsPSK 遺伝子のゲノム構成を示す、模式図である。

【図 3】 図 3 は、プライマー伸長反応及び S 1 マッピングを行った結果を示す写真である。

【図 4】 図 4 は、OsPSK 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。

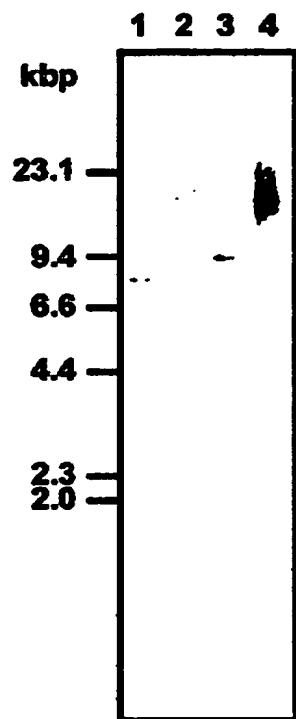
【図 5】 図 5 は、OsPSK-イントロン-GUS コンストラクトの構造を示した模式図である。

【図 6】 図 6 は、各 OsPSK-イントロン-GUS コンストラクトを導入して形質転換した Oc 細胞の GUS 活性を示す図である。

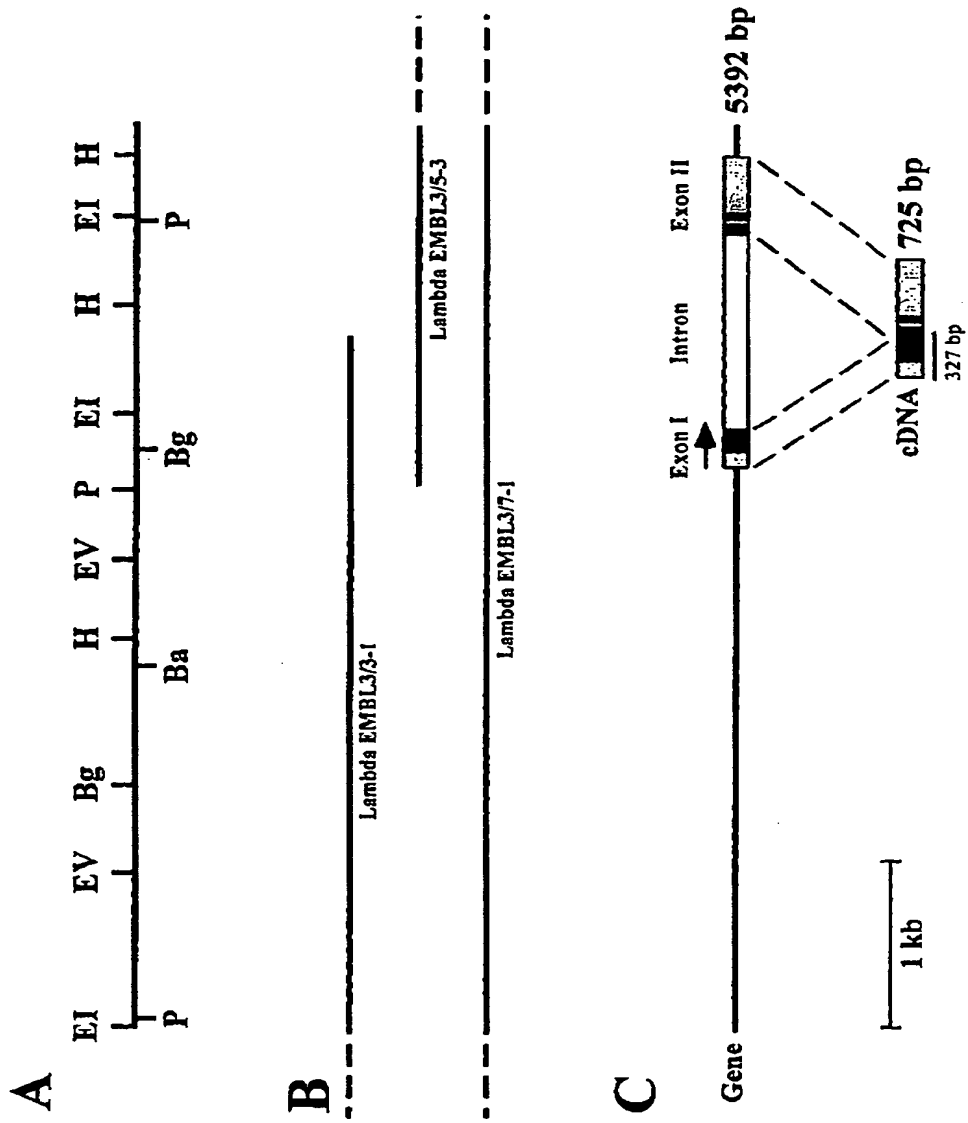
【図 7】 図 7 は、オーキシンとサイトカイニンによる、OsPSK::GUS 遺伝子の制御を示す図である。

【書類名】 図面

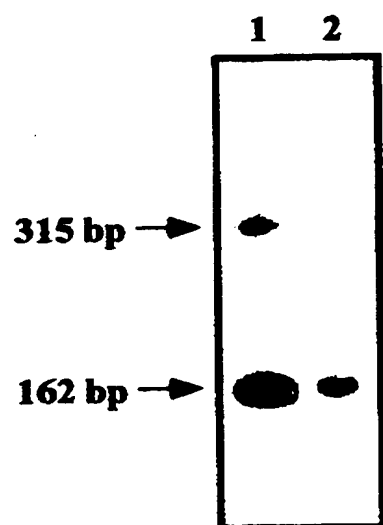
【図 1】



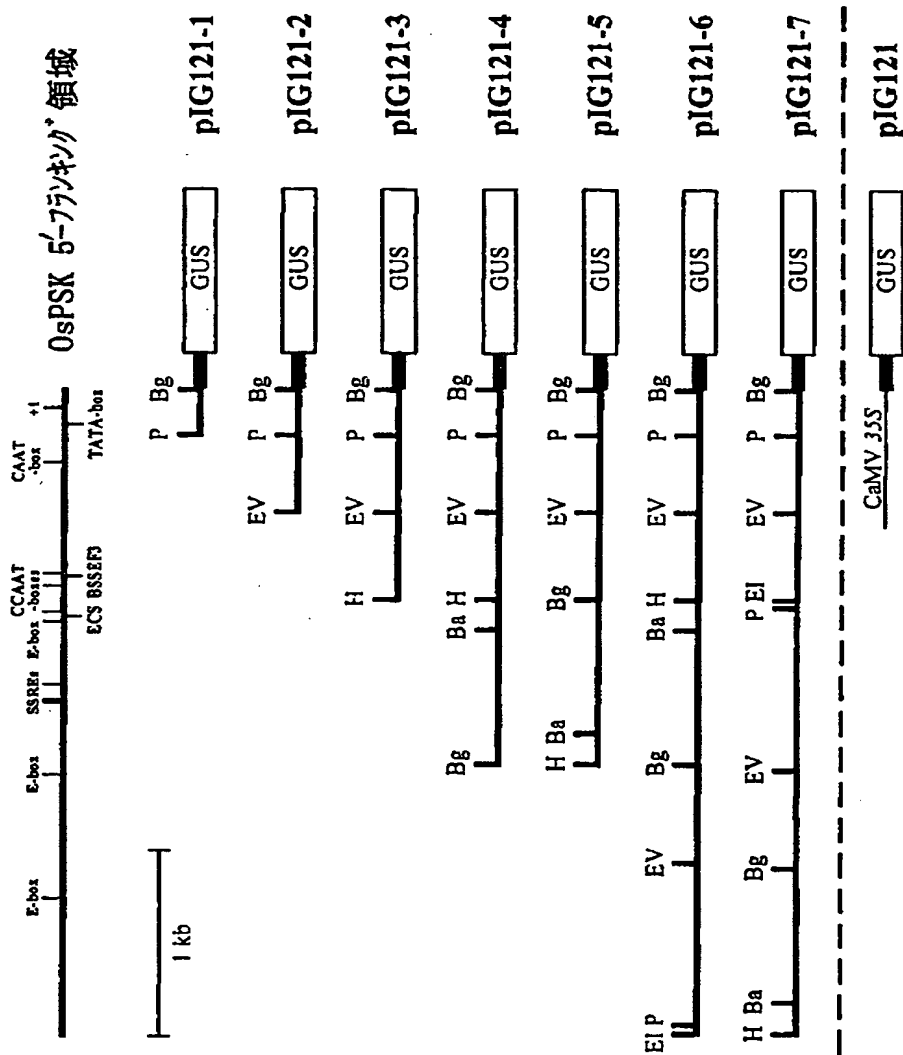
【図 2】



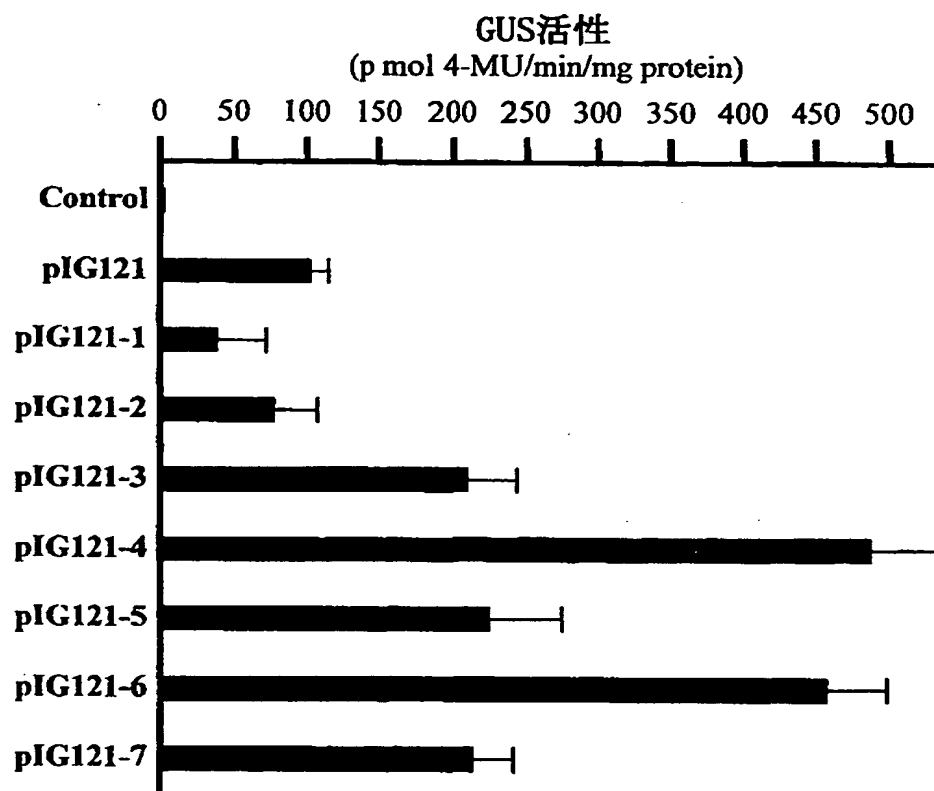
【図 3】



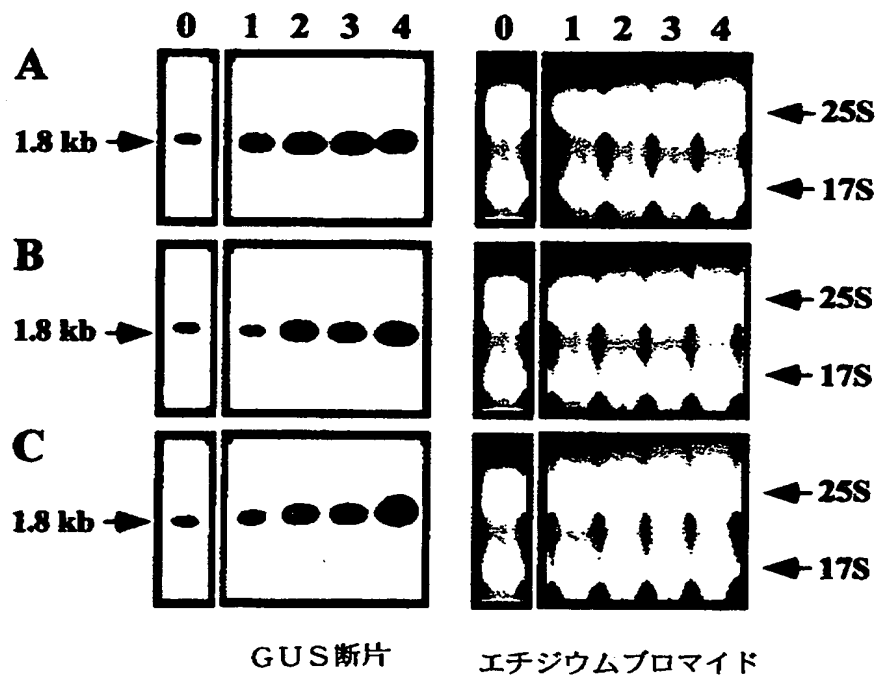
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーター以上のプロモーター活性を有する、新規なプロモーターを得る。

【解決手段】 本発明により、イネのファイトスルフォカイン前駆体遺伝子に由来する、新規なプロモーターが与えられた。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-179826
受付番号	50000746090
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0091
作成日	平成12年 6月16日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012224
【住所又は居所】	愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし）
【氏名又は名称】	名古屋大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】	100059258
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 暁秀

【選任した代理人】

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】	100098383
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3丁目2番4号 霞山ビル ディング7階 杉村萬國特許事務所内
【氏名又は名称】	杉村 純子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391012224]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区不老町 (番地なし)

氏 名 名古屋大学長

SWORN TRANSLATION

I, Noriko TSUJIMOTO, hereby declare and state that I am knowledgeable of each of the English and Japanese languages and that I made the attached translation of the certified copy of Japanese Patent Application No. 2000-179,826 from the Japanese language into English language and that I believe my attached translation to be accurate, true and correct to the best of my knowledge and ability.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date: March 22, 2004

Declarant:

Noriko Tsujimoto

Noriko TSUJIMOTO

[Identification of Document]	Petition for Patent Application
[Reference Number]	2000P039
[Date of Submission]	June 15, 2000
[Addressee]	Commissioner, Patent Office: Takahiko KONDO
[International Patent Classification]	A01H 1/00 012N 15/00
[Title of the Invention]	A promoter derived from phytosulfokine precursor gene
[Number of Claims]	9
[Inventor]	
[Address]	8-36, Nakata Jutaku, 1-9-11, Kitachikusa, Chikusa-Ku, Nagoya City, Aichi Pref., Japan
[Name]	Yoji SAKAGAMI
[Inventor]	
[Address]	104-205, Chiyogaoka Danchi, 1, Chiyogaoka, Chikusa-Ku, Nagoya City, Aichi Pref., Japan
[Name]	Heping YANG
[Inventor]	
[Address]	105, Faubourg Y, 3-34, Karayama-Cho, Chikusa-Ku, Nagoya City, Aichi Pref., Japan
[Name]	Yoshikatsu MATSUBAYASHI
[Applicant]	
[Identification Number]	391012224
[Name]	President of NAGOYA UNIVERSITY : Minoru MATSUO
[Representative]	
[Identification Number]	100059258
[Patent Attorney]	
[Name]	Akihide SUGIMURA
[Representative]	
[Identification Number]	100072051
[Patent Attorney]	
[Name]	Kosaku SUGIMURA
[Representative]	
[Identification Number]	100098383
[Patent Attorney]	
[Name]	Junko SUGIMURA

[List of Attached Items]

[Identification of Item]	Specification: 1
[Identification of Item]	Drawing : 1
[Identification of Item]	Abstract : 1
[General Authorization Number]	9709851

[Identification of Document] Specification

[Title of the Invention] A promoter derived from phytosulfokine precursor gene

[Claims]

[Claim 1] A promoter consisting of a base sequence of following (a) or (b):

(a) a promoter consisting of a base sequence represented by base numbers - 3359 to -1 shown in SEQ:ID NO:1 in the sequence list,

(b) a promoter in which a part of said base sequence (a) is deleted, substituted or added which has activity to enhance expression of a structural gene existing downstream of the promoter.

[Claim 2] A promoter consisting of a base sequence of following (c) or (d):

(c) a promoter consisting of a base sequence represented by base numbers - 1911 to -1 shown in SEQ:ID NO:2 in the sequence list,

(d) a promoter in which a part of said base sequence (c) is deleted, substituted or added which has activity to enhance expression of a structural gene existing downstream of the promoter.

[Claim 3] A promoter consisting of a base sequence of following (e) or (f):

(e) a promoter consisting of a base sequence represented by base numbers - 1034 to -1 shown in SEQ:ID NO:3 in the sequence list,

(f) a promoter in which a part of said base sequence (e) is deleted, substituted or added which has activity to enhance expression of a structural gene existing downstream of the promoter.

[Claim 4] A promoter consisting of a base sequence of following (g) or (h):

(g) a promoter consisting of a base sequence represented by base numbers -563 to -1 shown in SEQ:ID NO:4 in the sequence list,

(h) a promoter in which a part of said base sequence (g) is deleted, substituted or added which has activity to enhance expression of a structural gene existing downstream of the promoter.

[Claim 5] A gene encoding phytosulfokine precursor consisting of a base sequence represented by base numbers from -3359 to 2033 shown in SEQ:ID NO:5 in the sequence list.

[Claim 6] A plasmid vector in which the promoter according to any one of claim 1 to claim 4 was incorporated.

[Claim 7] A transgenic plant cell in which the promoter according to any one of

claim 1 to claim 4 was incorporated.

[Claim 8] A transgenic plant body in which the promoter according to any one of claim 1 to claim 4 was incorporated.

[Claim 9] A method for activating expression of an exogenous structural gene or an endogenous structural gene in a plant by incorporating the promoter according to any one of claim 1 to 4 into the plant.

[Detailed Explanation of the Invention]

[0001]

[Technical Field of the Invention]

This invention relates to a promoter derived from phytosulfokine precursor of rice and a transgenic plant produced by incorporation of the promoter to activate expression of an exogenous structural gene.

[0002]

[Prior Art]

In the field of plant cell engineering, it is generally carried out that a promoter is ligated to upstream of an exogenous gene of target, for over-expression of the exogenous gene by incorporation of it. In many cases, expression of the exogenous gene is not sufficient without existence of such promoter. Various promoters are utilized for this purpose and the method using cauliflower mosaic virus 35S promoter is the most conventional technique in this art. Here, a promoter means a regulatory gene region existing 5'-upstream of a structural gene. It is known that binding of RNA polymerase to a promoter serves as an initiation signal of transcription.

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

The method utilizing cauliflower mosaic virus (CAMV) 35S promoter is an excellent method for over-expression of an exogenous gene. However, in some cases, the extent of expression of the exogenous gene is not sufficient, depending on the exogenous gene to be incorporated and the species of the host plant which is the target of gene incorporation. Thus, there have been strong demands on a promoter with higher activity. It is the object of this invention to obtain a novel promoter with higher potency to activate a structural gene than that of CAMV35S promoter.

[0004]

[Solution for Problems]

The inventors noticed phytosulfokine (PSK), which is a peptide growth factor of a plant, and performed investigation on the growth factor. PSK is one of growth factors contained in so-called "conditioned medium:CM", a medium once used for cell culture. It is known that PSK is secreted into extra-cellular medium and functions in the manner like autocrine. At performance of plant cell culture, various known hormones or nutritional elements are generally added to the culture medium. However, in some plant species, cell culture is itself difficult or rate of cell proliferation is extremely slow. Moreover, when the density of a plant cell is extremely low, culture of the plant cell becomes difficult. Even in such cases, PSK is effective to enhance proliferation of a plant cell. It is also known that, the structure of PSK- α and PSK- β are defined by the following sequences wherein tyrosine residues of the PSKs are sulfated by post-translational modification.

PSK- α : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln

PSK- β : Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr

[0005]

It is known that the PSK- α and PSK- β are extra-cellular secreted peptides bio-synthesized in the form of their precursor, sulfated and processed during their transition via trans-Golgi network. The cDNA sequence of *Oryza sativa* phytosulfokine (*OsPSK*) which is such a precursor, have been already determined, using the technique of cDNA cloning. Moreover, the cDNA thus obtained and the polypeptide encoded by the cDNA are described in Japanese Patent Publication No. 11-079612. It is believed that incorporation of said gene into a plant can enhance proliferation of a plant cell.

[0006]

The inventor noticed the above-described knowledge and investigated to obtain a promoter that regulates expression of the *OsPSK* gene. Meanwhile, the base sequence described in Japanese Patent Publication No. 11-079612 is a cDNA sequence synthesized by reverse transcriptase reaction using mRNA as a template. Therefore, the sequence does not include non-translated region of the gene and the region corresponding to intron. In general, a regulatory region like a promoter is not translated. Therefore, to obtain *OsPSK* promoter, it is requisite to prepare

genomic DNA library, originated from total DNA of a cell, to obtain genomic DNA of *OsPSK* including regulatory region. Then, the inventors have prepared genomic library of *OsPSK* and performed cloning by plaque hybridization using the cDNA as a probe. As the result, full-length genomic sequence of PSK precursor gene was obtained and non-translated region and intron were included in the sequence. In the genomic sequence, it was revealed that a promoter which includes various consensus sequences, exists upstream of its open reading frame. Beta-glucuronidase (GUS) was incorporated downstream of the promoter and the potency of the promoter to activate expression of GUS gene was investigated. As the result, the potency of this promoter to activate expression of GUS gene was higher than that of CAMV35S promoter. Therefore, it was shown that the promoter might be a useful tool that enables constitutive activation of expression of an exogenous gene.

[0007]

[Detailed Description of the Preferred Embodiment]

This invention is a gene encoding phytosulfokine precursor, consisting of a base sequence defined by base numbers from -3359 to 2033 in SEQ.ID No.5 in the sequence list. The gene is a genomic DNA sequence encoding PSK precursor, obtained by preparing the genomic DNA library from rice Oc culture cells and screening of the genomic library by plaque hybridization using ³²P-labeled cDNA of *OsPSK* as a probe. The genomic DNA sequence and the cDNA sequence of the PSK precursor, which have already obtained, were compared and it was revealed that the genomic DNA sequence consisted of two exons and one large intron. The sequence encoding PSK, consisting of 5 amino acids, existed in the second exon. In SEQ.ID No.5 in the sequence list, base numbers from 1 to 1858 corresponds to the transcriptional region. The region of base numbers from 1 to 245 corresponds to the first exon, which encodes NH₂-terminal signal peptide and so on. The region of base numbers from 246 to 1395 corresponds to the intron and the region of base numbers from 1396 to 1858 corresponds to the second exon including PSK coding region. Moreover, the region of base numbers from 1396 to 1521 corresponds to the 3' downstream purlieu sequence. A putative TATA box was found at the position of -68 and some consensus sequences of potential regulatory elements were found further upstream of the sequence. Those are, one CAAT-box, three CCAAT-boxes, three SSREs (shear-stress-responsive element), one enhancer core-like sequence and three

E-boxes. Those are consensus sequences recognized that they commonly exist among many organisms and said to be involved in regulation of transcription. It is known that when a certain protein binds to each of these consensus sequences, the frequency of transcription is regulated by interaction between the protein and the DNA. [0008]

As described in the following embodiment, a plasmid containing fusion gene comprising 5'-region of *OsPSK* gene and β -glucuronidase (GUS) gene was prepared. The effect of 5'-region of *OsPSK* gene on GUS activity was investigated. As the result, the region containing 5'-regulatory elements of *OsPSK* gene enhanced activity of GUS gene and the potency was higher than that of CAMV35S promoter. Such promoter sequence derived from 5' region of *OsPSK* gene is defined by base numbers from -3359 to -1 in SEQ.ID No.1 in the sequence list. The promoter is transcription regulatory region of *OsPSK* gene and corresponds to the sequence incorporated utilized to incorporate into plasmid pIG121-6 (refer to Fig. 5) in the following example. In the *OsPSK* gene, this sequence is the longest sequence of the promoter that exhibits activity as a promoter and if a sequence longer than it was adopted, the activity as a promoter would decrease significantly.

[0009]

The 5' region of *OsPSK* gene maintains activity as a promoter, even if a shorter sequence of SEQ.ID No.1 is adopted. Promoter defined by the sequence consisting of the base sequence showed by base numbers from -1911 to -1 in SEQ.ID No.2 in the sequence list is one of such promoter. This region corresponds to the sequence incorporated into plasmid pIG121-4 (refer to Fig. 5) in the following example. In the *OsPSK* gene, this sequence corresponds to the region that exhibits maximum activity as a promoter.

[0010]

The region defined by promoter consisting of the sequence consisting of the base sequence showed by base numbers from -1034 to -1 in SEQ.ID No.3 in the sequence list, is also one of such region that maintains activity as a promoter. The region derived from the *OsPSK* gene corresponds to the sequence incorporated into plasmid pIG121-3 (refer to Fig. 5) in the following example.

[0011]

Furthermore, the region defined by the sequence consisting of the base

sequence showed by base numbers from -563 to -1 in SEQ.ID No.4 in the sequence list, is also one of such region that maintains activity as a promoter. The region derived from the *OsPSK* gene corresponds to the sequence incorporated into plasmid pIG121-2 (refer to Fig. 5) in the following example. This sequence corresponds to the minimum region of *OsPSK* gene that exhibits activity as a promoter. If a sequence shorter than it was adopted, the activity as a promoter would decrease significantly.

[0012]

According to technique of gene recombination, artificial modification can be achieved at a specific site of basic DNA, without alteration or with improvement of basic characteristic of said DNA. Concerning a gene having native base sequence provided according to this invention or base sequence different from said native sequence, it is also possible to perform artificial modification such as insertion, deletion or substitution to obtain gene of equivalent or improved characteristic compared with said native gene. Moreover, a gene with such mutation is also included in the range of this invention. A promoter in which a part of said promoter shown in SEQ ID NO: 1 in the sequence list is deleted, substituted or added with one or more bases means a promoter in which a part of base sequence shown in SEQ ID NO: 1 in the sequence list is deleted, substituted or added with one or more bases, which enhances expression of a structural gene existing in the downstream of the promoter. Such promoter exhibits homology 70% or more, preferably 80% or more and more preferably 90% or more compared with the base sequence shown in SEQ ID NO: 1 in the sequence list. Moreover, in such promoter, the number of bases deleted, substituted or added compared with the base sequence shown in SEQ ID NO: 1 is 20 or less, preferably ten or less, and more preferably five or less. Moreover, such promoter can hybridize with polynucleotide consisting of the base sequence shown in the SEQ ID NO: 1 in the sequence list under stringent condition. Then, a promoter in which a part of said promoter shown in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4 in the sequence list is deleted, substituted or added with one or more bases also means the same variations of the base sequences in this specification.

[0013]

Further, a plasmid, in which the promoter derived from rice *OsPSK* gene

described above was incorporated, is also within the scope of this invention. In the following example, pIG121 plasmid containing CaMV35S promoter and GUS reporter gene was adopted, but the scope of this invention is not to be limited to it. For example, other plasmids conventionally utilized in the art, such as pIG122, pBI101, pBI121, pBI221, pAct-nos/Hmz, pMAT037, pTA7001 and pTA7002, can be also adopted.

[0014]

A transformed plant produced by incorporation of the promoter of this invention to enhance expression of an exogenous gene is also within the scope of this invention. The example of plants, as a target of incorporation of the promoter of this invention to activate expression of an exogenous gene, may include dicotyledonous plants, such as tobacco, *Arabidopsis thaliana*, carrot, soybean, tomato and potato as well as monocotyledonous plants, such as rice, lily, maize, asparagus and wheat. In principal, any plant can be incorporated the promoter of this invention thereby activate expression of an exogenous gene. In the following example, when the transformation was carried out, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain was adopted, but not the scope of this invention is not to be limited to the strain. According to the species of the plant, which is the target of incorporation of genes, an *Agrobacterium* strain conventionally utilized in this art can be properly selected and adopted.

[0015]

In principal, any useful structural gene can be adopted as an exogenous structure gene of target to be incorporated downstream of the promoter to activate expression of the exogenous structure gene. In the following embodiment, GUS gene was incorporated but the scope of this invention is not to be limited to it. The preferred example of exogenous genes to be incorporated may include a gene encoding a factor that enhances growth of a plant, a gene involved in resistance against various environmental stresses, a gene involved in resistance against disease injury of a plant, a herbicide resistance gene and a gene encoding an enzyme involved in synthesis of a useful secondary metabolite.

[0016]

Moreover, a plant body obtained from a transgenic plant cell thus produced to activate expression of an exogenous gene and a method to produce a

transformed plant cell are also within the scope of this invention. In the following embodiment, this invention is elucidated in detail using rice culture cell as an example, above description and following embodiment is not to be considered to limit the scope of this invention.

[0017]

[Embodiments]

(Plant cell culture)

Rice Oc culture cells (Baba *et al.*, 1986) were subcultured at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ in the dark at 120 rpm in fresh Murashige and Skoog medium (MS; Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at regular intervals of 2 weeks.

[0018]

(Genomic DNA extraction and Southern blot analysis)

Genomic DNA was extracted from rice Oc culture cells cultured for 14 days using the CTAB method (Murray and Thompson, 1980), digested with restriction endonucleases, separated by electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose gels, and blotted onto Biodyne nylon membranes (Pall, Port Washington, NY, USA) in alkaline transfer buffer (0.4 N NaOH/0.6 N NaCl). Southern hybridization was performed in a solution of 5 x SSC, 0.5% SDS, 5 x Denhardt's solution and 500 $\mu\text{g/ml}$ Salmon sperm DNA at 50°C or 60°C using the *OsPSK* cDNA ^{32}P -labeled with a Random Primed DNA Labeling Kit (Takara, Tokyo, Japan). After hybridization, washing was performed with 2 x SSC at 25°C 15 min for 3 times and then 2 x SSC containing 0.1% SDS at 50°C or 65°C 15 min for 3 times.

[0019]

(Construction and screening of a genomic library)

Genomic DNA (50 μg) was partially restricted with *Sau3A* I to generate *Bam*HI-sensitive fragments ranging in size from 9 to 23 kb. The genomic fragments (0.3 μg) were inserted into the *Bam*HI site of EMBL3 vectors that had been digested with *Bam*HI and *Eco*RI (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and packaged with Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) to construct a genomic library. This was screened by plaque hybridization with the ^{32}P -labeled *OsPSK* cDNA. Hybridization and washing were executed under high stringency conditions at 65°C as described above.

[0020]

(Subcloning and DNA sequencing)

Restriction mapping of positive genomic clones was carried out by single and double restriction enzyme digestion. A series of fragments with the *OsPSK* gene were excised from positive phages, gel-purified, and subcloned into the corresponding sites of pBluescript II-KS (pBS) plasmids. Deletion clones were generated with a Kilo Sequencing Kit (Takara) according to the protocol recommended by the manufacturer. The plasmids containing the deleted fragments were introduced into *Escherichia coli* strain JM109 and sequenced completely on both strands. Double-stranded DNA sequencing were run using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), and analysis of the DNA sequence data was performed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) in accordance with the manufacturer's protocols.

[0021]

(Determination of transcriptional start site)

The transcriptional start site was established by both primer extension analysis and S1 mapping. Total RNA extracted from 2-week-old Oc culture cells after transplanting and a 32 nucleotide long primer with the sequence 5'-AGCAGGAGGAGAGCAAGGCATAGGAGGCAGAG-3' which is complementary to a region 32 nucleotides downstream of the ATG start codon in the *OsPSK* cDNA were used for both analyses. The oligonucleotide primer was 5'-end-labeled with 10 U of T4 polynucleotide kinase (Takara) and 30 μ Ci of [γ - 32 P]-ATP (3000 μ Ci/mmol). End-labeled primer was annealed with 10 μ g of total RNA for 1 h at 60°C. The primer extension reaction was carried out according to the published procedure (Sambrook *et al.*, 1989) at 30°C for 1 h with 20 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Stratagene). For S1 mapping, a 3.6-kb EcoRI fragment from the *OsPSK* gene and the end-labeled primer were used to synthesize one strand DNA. A 315-bp fragment was excised and purified from the synthesized DNA with PstI and used as the S1 probe, hybridized to 30 μ g of total RNA at 60°C and incubated with 300 units/ml S1 nuclease (Takara) for 30 min at 30°C. The reaction products in both experiments were simultaneously analyzed on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea.

[0022]

(Construction of chimeric genes)

The plasmid pIG121 contains the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, a modified intron of the castor bean catalase gene, and the GUS reporter gene (Akama *et al.*, 1992). This CaMV 35S- Intron-GUS reporter gene is expressed in plants but not in cells of *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) (Ohta *et al.*, 1990). The pIG121 harbors a kanamycin resistance gene which can be used to select transformants. The plasmid pIG121 was digested by *HindIII*-*XbaI* to remove the CaMV 35S promoter and various fragments from the 5' region of the *OsPSK* gene were inserted into the *HindIII*-*XbaI* sites of the binary vector to construct chimeric genes. A 241-bp *PstI*-*BglII* fragment from the 5' region of the *OsPSK* gene was subcloned into pBS at the *PstI*-*BamHI* sites. The fragment was excised by *HindIII*-*XbaI* from pBS-1 and cloned between the same sites of the promoter-less pIG121 to construct pIG121-1. Introduction of a 662-bp *HindIII*-*XbaI* fragment from pBS-2 containing the *EcoRV*-*BglII* fragment into the same sites of the promoter-less pIG121 produced pIG121-2. The 1.1-kb *HindIII*-*BglII* fragment of the 5' region of the *OsPSK* gene was subcloned into the *HindIII*-*BamHI* sites of pBS to produce pBS-3. The plasmid pIG121-3 was generated by introduction of the 1.1-kb fragment from pBS-3 into the *HindIII*-*XbaI* sites of the promoter-less pIG121. The 2-kb *BglII*-*BglII* fragment of the 5' region of the *OsPSK* gene was subcloned into the *BamHI* site of pBS to produce pBS-4. A 877-bp *HindIII*-*HindIII* fragment was excised from pBS-4 and inserted into the same site of pIG121-3 in both possible orientations to produce pIG121-4 and pIG121-5. The 3.7-kb *EcoRI*-*EcoRI* fragment of *OsPSK* was isolated and cloned into the same site of pBS to produce pBS-5, which was then cleaved by *HindIII* and the 2.3-kb fragment inserted into the same sites of pIG121-3 in both possible orientations to construct pIG121-6 and pIG121-7.

[0023]

Here, the sequence incorporated into pIG121-1 corresponds to the region represented by base numbers from -148 to -1 in SEQ ID NO: 5 in the sequence list. The sequence incorporated into pIG121-2 corresponds to the region represented by base numbers from -563 to -1. The sequence incorporated into pIG121-3 corresponds to the region represented by base numbers from -1034 to -1. The sequence

incorporated into pIG121-4 corresponds to the region represented by base numbers from -1911 to -1. The sequence incorporated into pIG121-5 is the same region incorporated into pIG121-4, but the region corresponding to base numbers from -1911 to -1034 is incorporated in the reverse orientation. The sequence incorporated into pIG121-6 corresponds to the region represented by base numbers from -3359 to -1. The sequence incorporated into pIG121-7 is the same region incorporated into pIG121-6, but the region corresponding to base numbers from -3359 to -1034 is incorporated in the reverse orientation.

[0024]

(*Agrobacterium*-mediated transformation of rice Oc cells)

The constructs were introduced into *A. tumefaciens* strain LBA4404 by triparental matting. *A. tumefaciens* cells were grown for 3 days on AB agar medium containing 50 mg/liter kanamycin at 30°C in the darkness. The bacteria were collected with a small spoon, and suspended in AAM medium (Yang *et al.*, 2000a) at a density of OD₆₀₀ = 0.2. Oc cells that were pre-cultured for 3 days at 25°C in the dark on fresh MS medium supplemented with 1.0 mg/l of 2,4-D prior to infection were immersed in 4 ml of the bacterial suspension in 90 mm × 20 mm Petri plates (Terumo, Tokyo, Japan). The plates were sealed with parafilm and co-cultivation was carried out in the dark at 28°C for 3 days. After 3 days, cultures were collected into Falcon 2097 tubes. Oc cells were collected by centrifugation at 1,000 rpm (MX-160 centrifuge, TMA-27 angle rotor; Tomy) for 1 min, resuspended in MS medium, mixed well by gentle vortexing, and then centrifuged at 1,000 rpm for 1 min. After centrifugation, the supernatant was discarded. This rinsing process was repeated for 3 to 5 times to exclude *A. tumefaciens* cells. The rinsed Oc cells were cultured on fresh MS medium supplemented with 1.0 mg/l of 2,4-D, 50 mg/l kanamycin, and 250 mg/l cefotaxime to select transformed cells.

[0025]

(Quantitative analysis of GUS activity)

More than 5 independent transformed cell lines for each construct were cultured for 7 days on selection medium for measurement of GUS activity. Total soluble protein was isolated from the transformed Oc cells in a GUS extraction buffer (Jefferson *et al.*, 1987) and activity was quantitatively assayed by the fluorometric reaction procedure of Jefferson *et al.* (1987) using 4-umbelliferyl-β-D-glucuronide

(Sigma, St. Louis, MO, USA). The amount of protein was determined with a Bio-Rad Laboratories kit by the method of Bradford (1976).

[0026]

(RNA isolation and Northern blot analysis)

Oc cells transformed with the plasmid pIG121-4 were cultured for 0, 12, 24, 48, and 72 h, respectively, in MS media supplemented with different combinations of phytohormones: 2 mg/l of 2,4-D only, 2 mg/l of 6-BA only, or 1 mg/l each of 2,4-D and 6-BA. Total RNA (20 µg per lane) isolated from various samples by a published method (Chomczynski, 1993) was denatured and fractionated by electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gels containing 2.2 M formaldehyde. The RNAs were subsequently transferred to Biodyne nylon membranes (Pall) in 20 × SSC. The filters were hybridized to a random-primed probe of the *gusA* gene as described above.

[0027]

(Copy number of *OsPSK* gene)

The inventors previously characterized *OsPSK* cDNA in rice encoding the precursor of PSK-α, a peptide growth factor identified from plants. Prior to the isolation of genomic clones corresponding to *OsPSK* cDNA, the copy number of this gene in the rice genome was investigated by genetic Southern blotting. The full-length *OsPSK* cDNA was used as probe DNA blot analysis under low stringency conditions revealed only one band in DNA digested with three different restriction enzymes, except *EcoRI* that generated two strong and one weak hybridizing bands (Yang *et al.*, 1999). When the Southern blot was hybridized to the probe under high stringency conditions, only the strong bands were detected in *EcoRI*-digested DNA. These two hybridizing bands were expected by the restriction site residing in the coding region of *OsPSK* cDNA. To verify this notion, the inventors reprobed the blot using a 300-bp fragment from the 5' terminus of *OsPSK* cDNA. As expected, only one band of 3.6 kb was hybridized under either low or highly stringent conditions. The result of DNA blot analysis of *OsPSK* gene is shown in Fig. 1. In Fig. 1, the genomic DNA isolated from Oc cells was digested with either *BamH* I (lane 1), *EcoR* I (lane 2), *Xba* I (lane 3) or *Xho* I (lane 4) and hybridized with the radio-labeled probe derived from 5' end of the *OsPSK* cDNA. The result indicated that *OsPSK* is a single-copy gene. Indeed, screening of a genomic library allowed

the isolation of only one group of genomic clones.

[0028]

(Isolation of the *OsPSK* gene)

A genomic library was constructed with λ EMBL3 phages and *Sau3A*I-digested DNA fragments prepared from rice Oc culture cells, and screened with the *OsPSK* cDNA as a probe. The overlapping clones containing fragments obtained from *OsPSK* gene were obtained from *OsPSK* gene. In Fig. 2B, three overlapping genomic clones containing fragments of *OsPSK* gene are shown. Their clones were designated λ EMBL3/3-1, λ EMBL3/5-3, and λ EMBL3/7-1. These clones, classified into 3 subgroups, overlapped and spanned a region of more than 45 kb of the rice genomic DNA. To begin analyses of the *OsPSK* genomic structure and regulatory regions, the inventors carried out restriction mapping of the three λ EMBL3 phage clones (Fig. 2B) by single and double restriction enzyme digestion as well as Southern hybridization. The resulting restriction map of the genomic fragment of the *OsPSK* gene is shown in Figure 2A. In Fig. 2, the restriction sites are abbreviated as follows : Ba;*Bam*HI, Bg;*Bgl*II, EI; *Eco*RI, EV; *Eco*RV, H;*Hind*III, P;*Pst*I. The 22.8-kb λ EMBL3/7-1 insert was found to contain the entire *OsPSK* gene including the 5'-upstream region, the full-length transcribed sequence corresponding to *OsPSK* cDNA, the non-coding intron, and the 3'-downstream region. The genomic structure of *OsPSK* gene is shown in Fig. 2C. In Fig. 2C, the transcription direction of the *OsPSK* gene is marked by a horizontal arrow and the intron is shown by an open box. Noncoding and coding portions of *OsPSK* exons are indicated by shaded and striped boxes, respectively. The sequence encoding PSK- α within the second exon is depicted by a white bar. The horizontal bar labeled "327-bp" represents the probe used for genomic DNA hybridization.

[0029]

(Determination of the transcription start site of the *OsPSK* gene)

The transcription start site of the *OsPSK* gene was determined by primer extension analysis and S1 mapping (Fig. 3). In Fig. 3, the reaction products of the S1 nuclease (lane 1) and the primer extension experiments (lane 2) were subjected to electrophoresis on a polyacrylamide gel. The sizes of the probe used for S1 mapping and the products in both experiments are indicated in kb on the left. One 32-base-long oligodeoxyribonucleotide corresponding to the 5'-end region of the

OsPSK cDNA was used as a primer (Fig. 4) and primer extension reaction was carried out. Total RNA extracted from *Oc* culture cells were used as a template, and the products were analyzed by autoradiography after electrophoresis in a polyacrylamide gel. One band about 162-bases in length was detected from the extension product (Fig. 3). Next, the inventors prepared a 315-bp probe using a 3.6-kb *EcoRI* fragment from the *OsPSK* gene and the ^{32}P -labeled primer followed by *PstI* digestion. Then the inventors performed S1 nuclease analysis using the ^{32}P -labeled 315-bp fragment as a probe. After the probe was hybridized with total RNA, it was digested with S1 nuclease and then a product of 162-bases was again detected (Fig. 3). This size is identical to that from the 5'-terminal residue to the position complementary to the primer. Therefore, the first guanine of the *OsPSK* cDNA, located 62 nucleotides downstream of the TATA box, was designated +1. Most likely it represents the 5' end of the *OsPSK* transcript (Fig. 4).

[0030]

(Genomic organization of the *OsPSK* gene)

The nucleotide sequence of a 7.4-kb region corresponding to harboring the entire *OsPSK* gene in the genomic clone $\lambda\text{EMBL3/7-1}$ was completely determined on both strands sequences and its structure analyzed. In Fig. 4, nucleic acid and deduced amino acid sequences of the *OsPSK* gene are shown. In Fig. 4, the transcription initiation site is designated +1 and a TATA-box is boxed. A CAAT-box, three E-boxes, three CCAAT-boxes, a enhancer core-like sequence, and three SSREs are indicated with underlining. The binding site for the regulatory nuclear protein SEF3 is marked by a striped line up the sequence, and a polyadenylation signal is labeled by double underlining. The sequence complementary to the primer used for primer extension and S1 nuclease analyses is indicated by a dashed line. The vertical arrows show the positions used in the construction of the various *OsPSK*-Intron-GUS fusion plasmids. The amino acid sequence is represented using the single-letter amino acid code. The amino acid sequence of PSK- α is indicated by the bold capital letters and the translation termination codon is marked with an asterisk. Sequence comparison of this fragment and the cDNA revealed that the *OsPSK* gene consisting of two exons (245 bp and 463 bp), which perfectly match the cDNA sequence, is interrupted by a large intron of 1150 bp with a well-conserved GT-AG intron border sequence. An in-frame TGA stop codon

was found 337 bp upstream of the Met codon of the first exon, including the 5' noncoding region and a coding region for about half of the PP-PSK (preprophytosulfokine), i.e. 48 out of 89 amino acid residues of the precursor, including the initiation methionine. A 22 amino acid NH₂-terminal hydrophobic region that presumably acts a signal was found in the first exon. The second exon was determined to consist of the 3' non-coding region and a coding region for the remaining 41 amino acid residues of the PP-PSK, within which the PSK- α sequence occurred only once, close to the COOH-terminus. A poly adenylation signal consisting of an AAATTAA sequence was identified at positions 1629 to 1635.

[0031]

(Characterization of the 5'-upstream region of the *OsPSK* gene)

The inventors searched the 5'-upstream region of the *OsPSK* gene for some known motifs of other genes or some regulatory regions of them. In results, several potential regulatory elements were found in 5'-upstream region (Fig. 4). The consensus sequence of a putative TATA box (5'-TATAA-3') was found at positions -63 to -68, referring to the transcription initiation site. Upstream to this sequence, there are one CAAT-box at -267 to -270 and three CCAAT-boxes at -906 to -910, -949 to -953, and -1074 to -1078, respectively. Interestingly, the sequence AACCCA (at -908) conforms to the A(A/C/G)CCCA consensus sequence which is the binding site of a soybean enhancer for the regulatory nuclear protein SEF3 (Allen *et al.*, 1989), and an 8-nucleotide enhancer core-like motif located at position -1105 to -1112 with the sequence 5'-GTGGAAAG-3'. Additionally, three E-boxes (consensus sequence: 5'-CANNTG-3'; Pabo, 1992), three shear-stress-responsive elements (SSRE: 5'-GAGACC-3'; Resnick *et al.*, 1993), and several repetitive sequences are present in this 5'-end region. These findings suggest that transcription may be influenced by a variety of genetic elements.

[0032]

(Expression of *OsPSK*::GUS chimeric genes in transformed cells)

To determine the *OsPSK* 5'-upstream sequence required for its expression, the CaMV 35S promoter in the plasmid pIG121 was replaced with various fragments from the 5' region of the *OsPSK* gene. In Fig. 5, the structure of *OsPSK*-Intron-GUS constructs are shown. In Fig. 5, a schematic diagram of the 5'-upstream region of *OsPSK* is shown at the top. The locations of the putative

regulatory elements are indicated in the schematic diagram. Maps of constructs containing various portions of the 5'-upstream sequence (thick line) fused to the GUS gene (open box, not to scale) and their respective names are shown below the schematic diagram. The indicated restriction enzyme sites are abbreviated as in Fig. 2. BSSEF3; the binding site of a soybean enhancer for the regulatory nuclear protein SEF3, ECS; enhancer core sequence, SSREs; shear-stress-responsive elements. Dashed lines indicate fragments in reverse orientation. As a positive control, the inventors used the original pIG121 containing the CaMV 35S promoter (Ohta *et al.*, 1990). These constructs were introduced into Oc suspension culture cells via *Agrobacterium* infection, and transformed cells were selected on MS agar medium supplemented with 50 mg/l kanamycin (Yang *et al.*, 1999). For each construct, the inventors assayed GUS activity (Jefferson *et al.*, 1987) in more than 5 independent transformed clones. The results of these assays are presented in Fig. 6. GUS activity is the mean of three independent experiments and indicated with the standard deviation.

[0033]

The inventors constructed five *OsPSK*-Intron-GUS plasmids, pIG121-1, pIG121-2, pIG121-3, pIG121-4, pIG121-6, and determined the minimum length of the *OsPSK* 5'-upstream sequence required for maximal GUS activity. Transformed cells harboring these plasmids all displayed positive GUS activity and non-transformed cells as negative controls had no detectable GUS expression. The plasmid pIG121-1 harboring the shortest 5'-upstream region, which has no putative regulatory elements except TATA box, showed the lowest GUS activity. The highest GUS activity was recorded for the plasmid pIG121-4, within which most of the 5'-putative regulatory elements including SSRE and enhancer core motif are located, indicating that the region 1.9 kb upstream of the *OsPSK* transcription initiation site has the minimal region of *OsPSK* sequence necessary for maximal GUS activity in transformed Oc cells. The cells transformed with pIG121-6, with the longest *OsPSK* 5'-upstream region, displayed similar GUS activity to cells transformed with pIG121-4.

[0034]

To test for any potential enhancer-like activity within the *Bgl*II-*Hind*III fragment of the *OsPSK* 5'-upstream region in pIG121-4 but not in pIG121-3, the

inventors constructed the plasmid pIG121-5 containing the *Bgl*II-*Hind*III fragment in the opposite orientation to that in pIG121-4. The GUS activity in cells transformed with this construct markedly decreased the activity recorded in cells transformed with pIG121-4 (Fig. 6). The inventors also constructed pIG121-7 in which the 2.3-kb *Eco*RI-*Hind*III fragment in pIG121-6 inserted in reverse orientation into pIG121-3. The plasmid pIG121-7 demonstrated GUS activity similar to that of the pIG121-3 and pIG121-5. These results suggested that the enhancer elements may be involved in the maximal GUS expression, with enhancement being orientation-dependent.

[0035]

The GUS reporter gene under the control of the *OsPSK* 5'-upstream region yielded GUS activity approximately 2 to 5 times higher than that obtained with the GUS gene controlled by the CaMV 35S promoter in the transformed Oc cells, suggesting that it contains an efficient promoter for regulating the constitutive expression of a foreign gene in transformed rice Oc culture cells.

[0036]

(Influence of exogenous auxin and cytokinin)

The inventors performed RNA blot analyses to investigate how exogenous phytohormones affect the expression of *OsPSK::GUS* gene in transformed Oc cells. Exogenous auxin (1 mg/l of 2,4-D) and/or cytokinin (1 mg/l of 6-BA) were added into MS media to treat Oc cells transformed with the plasmid pIG121-4. Total RNA was isolated from the various samples and subjected to Northern blot analysis. Exogenous auxin and cytokinin regulation of the *OsPSK* promoter in Oc cells transformed with introduction of pIG121-4 is shown in Fig. 7. In Fig. 7, steady-state *gusA* mRNA levels were examined by Northern blotting (left panel) and ribosomal RNA levels were examined by ethidium bromide staining (right panel). The transformed Oc cells were harvested 0 (lane 0), 12 (lane 1), 24 (lane 2), 48 (lane 3), and 72 h (lane 4) after auxin and/or cytokinin treatment. Total RNA was extracted from each sample and Fig. 7 shows the result of hybridization with the radio-labeled *Xba*I-*Sac*I fragment of pIG121 which contains the GUS coding region. Fig. 7A shows the result of MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, and the level of GUS mRNA increased significantly at 12 h after the onset of 2,4-D treatment, and reached a maximum level by 48 h (Fig. 7A). Fig. 7B shows the result of MS medium supplemented with 2 mg/l 6-BA and the expression of *OsPSK::GUS* gene

was also reinforced by 6-BA 24 h after treatment, although decrease of GUS transcripts was apparent at 48 h (Figure 7B). Fig. 7C shows the result of MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l 6-BA. The 2,4-D treatment combined with 6-BA resulted in a consistent increase in the mRNA level throughout the treatment period (Fig. 7C). These results suggested that both exogenous auxin and exogenous cytokinin may enhance the expression of *OsPSK* in Oc culture cells. [0037]

The inventors previously isolated *OsPSK* cDNA from rice Oc culture cells (Yang *et al.*, 1999). Gain-of-function and loss-of-function studies proved that *OsPSK* cDNA encodes the precursor of PSK- α , a peptide growth factor identified from plants. In the present investigation, the inventors identified and characterized the *OsPSK* gene in rice. Southern blotting analyses revealed *OsPSK* to be a single-copy gene (Fig. 1), consisting of two exons identical to the cDNA sequence, and a large intron (Fig. 2) conserved GT-AG intron border sequence. The first exon contains the 5' noncoding region and a coding region for about half of the PP-PSK (preprophytosulfokine) including the 22 amino acid NH₂-terminal hydrophobic region that presumably acts a signal peptide (von Heijne, 1986). No signals that might cause retention of protein along the secretory pathway (Nakai and Kanehisa, 1992) were detected in the sequence of PP-PSK, indicating that the protein may be extracellular protein and its active form, PSK- α , could therefore act as the ligand for its receptor. The second exon consists of the 3' non-coding region and a coding region within which the 5-amino acid PSK- α sequence occurs only once, close to the COOH-terminus. [0038]

Rice Oc cells can be simply maintained in/on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D with dilution at regular intervals of 2 weeks. The inventors have previously shown that they can serve as an excellent starting material to study the synthesis and physiological function of PSK- α (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000a). In the present study, the inventors constructed plasmids with the 5' upstream regions of the *OsPSK* gene fused to the Intron-GUS reporter gene (Ohta *et al.*, 1990) with a modified intron of the castor bean catalase gene within its N-terminal GUS coding sequence. When placed under the control of the CaMV 35S promoter, the Intron-GUS reporter gene expresses GUS activity with a similar level

and pattern as obtained with the original GUS activity in tobacco cells but not in *Agrobacterium* cells (Ohta *et al.*, 1990). Furthermore, a significant stimulating effect on GUS synthesis by the intron has been observed in rice cells (Tanaka *et al.*, 1991), indicating that the Intron-GUS reporter gene is useful to detect expression of foreign genes in rice cells. On fusing various lengths of the 5' upstream region of the *OsPSK* gene, the minimum length of the *OsPSK* 5'-upstream sequence required for the expression of maximal GUS activity was here found to be a region 1.9 kb upstream of the transcription start site (Fig. 3). This region is approximately 5 times more active than the CaMV 35S promoter in transformed Oc cells, suggesting that it contains an efficient promoter for regulating the constitutive expression of a foreign gene in transformed Oc culture cells.

[0039]

Within the 5'-upstream region of the *OsPSK* gene, several known motifs which are regulatory elements were found (Fig. 3). One of the most notable features of the *OsPSK* promoter is the presence of three CCAAT-boxes, which is a target for binding to CCAAT-box/enhancer-binding protein (Ryden and Beeemon, 1989). Furthermore, the inventors identified three SSREs in the 5'-upstream region of the *OsPSK* gene. They are cis-acting components within the promoter of several human genes expressed in endothelial cells such as those for the platelet-derived growth factor β chain and transforming growth factor β 1 (Resnick *et al.*, 1993). They interact with DNA binding proteins and are necessary for shear-stress responsiveness. Deletion of the region containing these regulatory elements resulted in rather low GUS expression (Fig. 6), suggesting that those elements may be actually involved in *OsPSK* expression. In addition, three E-boxes are located in the 5'-end region of *OsPSK*. The E-box, with a consensus sequence 5'-CANNTG-3', known as to be a recognition site for a class of transcription factors, can form homo- and hetero-dimers to exert regulatory function (Li and Capetanaki, 1994). Gbox elements of which comprise a family of cis-acting sequences that have been shown to be involved in the regulation of gene expression in response to variety of factors in plants as well as in animals (Baker *et al.*, 1997; Dolferus *et al.*, 1994). PSK- α promotes the growth and increase the chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions (Yamakawa *et al.*, 1999), suggesting that the E-box conserved in the PSK- α precursor gene may have

regulatory functions in the response to environmental stress.

[0040]

An 8-nucleotide enhancer core-like motif, GTGGAAAG, exists in the 5'-upstream region of *OsPSK* (Fig. 3). This sequence is the most common among known viral enhancers and dramatically increases the transcriptional activity of certain genes (Weiher *et al.*, 1983). It is also present in the 5'-upstream region of the human ornithine transcarbamylase gene (Hata *et al.*, 1987) and these findings suggest that the enhancer sequence is universally conserved from viruses to eukaryocytes. The 1.9-kb 5'-upstream region of the *OsPSK* gene containing the enhancer core-like motif was here shown to be necessary and efficient for maximal-level GUS expression, and that this region was even higher active than the CaMV 35S promoter in transformed rice Oc cells (Fig. 5). The enhancer core-like motif in the *OsPSK* gene may have some functional role in the high-level expression of the *OsPSK::GUS* gene, and this promoting activity was dependent on the orientation introduced gene.

[0041]

When explanted into culture, many plant tissues dedifferentiate and resume division to form proliferating calli. Induction of cell division and subsequent callus formation normally require the simultaneous presence of both auxin and cytokinin. Hence, cell proliferation could be a direct response to auxin and cytokinin or an indirect response caused by PSK- α which reached to a constant level under their control. In suspension-cultured asparagus mesophyll cells, PSK- α can be produced only when both 1-naphthalene acetic acid and 6-BA are present in the medium. No significant amount of PSK- α is produced if either of these plant hormones is eliminated from the medium, suggesting that both auxin and cytokinin are normally required for the production of PSK- α (Matsubayashi *et al.*, 1999a). Here, the inventors could show that both exogenous auxin and exogenous cytokinin reinforce the expression of *OsPSK::GUS* in transformed Oc cells (Fig. 7). However, because exogenous hormones may not reflect the endogenous modulation of hormone levels, many more experiments remain to be done before drawing a final conclusion.

[0042]

(References)

(1) Akama, K., Shiraishi, H., Ohta, S., Nakamura, K., Okada, K. and Shimura, Y.

1992. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotype and *Agrobacterium* strains. *Plant Cell Rep.* 12: 7-11.
- (2) Allen, R.D., Bernier, F., Lessard, P. and Beachy, R.N. 1989. Nuclear factors interact with a soybean β -conglycinin enhancer. *Plant Cell* 1: 623-631.
- (3) Baba, A., Hasezawa, S. and Syono, K. 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* 27: 463-471.
- (4) Baker, S.S., Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* 24: 701-713.
- (5) Bisseling, T. 1999. The role of plant peptides in intercellular signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 365-368.
- (6) Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- (7) Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15: 532-536.
- (8) Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* 105: 1075-1087.
- (9) Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. and Meyerowitz, E.M. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.
- (10) Franssen, H.J. 1998. Plants embrace a stepchild: the discovery of peptide growth regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 384-387.
- (11) Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kamada, H. and Sakagami, Y. 2000a. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol.* 41: 27-32.
- (12) Hanai, H., Nakayama, D., Yang, H., Matsubayashi, Y., Hirota, Y. and Sakagami, Y. 2000b. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine O-sulfation of preprophytosulfokine variants in *vitro*. *FEBS Lett.* 470: 97-101.

- (13) Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M. and Matsuda I 1986. Isolation and characterization of the human ornithine transcarbamylase gene: structure of the 5'-end region. J. Biochem. 100 :717-725.
- (14) Huttner, W.B. 1984. Determination and occurrence of tyrosine O-Sulfate in protein. Meth. Enzymol. 107: 200-223.
- (15) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
- (16) Jung, L.J. and Scheller, R.H. 1991. Peptide processing and targeting in the neuronal secretory pathway. Science 251: 1330-1335.
- (17) Kobayashi, T., Eun, C.-H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Kamada, H. 1999. Phytosulfokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates cell division that leads to somatic embryogenesis in carrot. J. Exp. Bot. 50: 1123-1128.
- (18) Li, H. and Capetanaki, Y. 1994. An E box in the design promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription. EMBO J. 13: 3580-3589.
- (19) McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M. and Ryan, C.A. 1992. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. Science 255: 1570-1573.
- (20) Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. 1996. Phytosulfokine, sulfated peptides that induced the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7623-7627.
- (21) Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. and Sakagami, Y. 1996. Active fragments and analogs of the plant growth factor, Phytosulfokine: structure-activity relationships. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225: 209-214.
- (22) Matsubayashi, Y., Takagi, L., and Sakagami, Y. 1997. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13357-13362.
- (23) Matsubayashi, Y., Morita, A., Matsunaga, E., Furuya, A., Hanai, N. and Sakagami, Y. 1999a. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. Planta 207: 559-565.
- (24) Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A. and Sakagami, Y. 1999b.

The endogenous sulfated pentapeptide, phytosulfokine- α , stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 120: 1043-1048.

(25) Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. 1999. Characterization of specific binding sites for an endogenous sulfated pentapeptide, phytosulfokine- α , in the plasma membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. *Eur. J. Biochem.* 262: 666-671.

(26) Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

(27) Murry, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.

(28) Nakai, K. and Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911.

(29) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.

(30) Pabo, C.O. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.

(31) Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bomthron, D.T., Dewey, C.F. Jr. and Gimbrone, M.R. Jr. 1993. Platelet-derived growth factor β chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4591-4595.

(32) Ryden, T.A. and Beemon, K. 1989. Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 9: 1155-1164.

(33) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

(34) Schaller, A. 1999. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 40: 763-769.

(35) Tanaka, A., Mita, S., Ohta, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. and Nakamura, K. 1991. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA an efficient splicing of the intron. *Nucl. Acids Res.* 18: 6767-6770.

(36) von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage

sites. Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690.

(37) Weither, H., Konig, M. and Gruss, P. 1983. Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer. Science 219: 626-631.

(38) Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H. and Satoh, S. 1999. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 2240-2243.

(39) Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. 1999. *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13560-13565.

(40) Yang, H., Morita, A., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. 2000a. Rapid and efficient Agrobacterium infection-mediated transient gene expression in rice Oc cells and its application for expression and antisense suppression of *OsPSK* cDNA for a precursor to phytosulfokine- α , a peptide plant growth factor. Plant Cell Physiol. 41: (in press)

(41) Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H. and Sakagami, Y. 2000b. Phytosulfokine- α , a peptide growth factors found in higher plant: its structure, functions, precursor and receptors. Plant Cell Physiol. 41: (in press)

[0043]

[Sequence list]

<110> Applicant name: President of Nagoya University

<120> Title of invention: A promoter derived from phytosulfokine precursor gene

<160> Number of SEQ ID Nos: 5

<210> SEQ:ID NO: 1

<211> Length: 3359

<212> Type: Nucleic acid

<213> Organism: *Oryza sativa* L. Oc cell

<400> Sequence

-3359

```
GAATTCCTGG TTTAGTTTTC TATTAGTTGG GCACAAGATC ATAAGTGCAG TATTGTATTT 3300
AAGATTCAAC ACAGGTTCAA TTTGTCACAC CCTGTAATTT GGCATCTACA ATCTGAAAAT -3240
GAATGGCTAA TCAAAAGGCT CTGAGCACAC AAATGGCTAA TTTCTTCCAT CTAGTTGAGA 3180
AACCTTTCAA TTATACAAAT GGAAAAGATA TGGATGTGAT TTGTGGGCTG AAAACCCTTT 3120
GATAATCAAC AATTGTTAGT GCCTTCAACT TTCAATGCAC CCATGTTTTTC TTGTTACGTT 3060
TGCAAGATCA AAACAATGTT GGAAACGTCA TCTCGCCAGG TAAAGCAATG AATGACGACA 3000
ATTAAGAAGA TTTTGTCTCC TGAAGACTAC TAATGATGGA TATTAAGGGT ATAATAACCT 2940
ATCCAGGATT GTGATGTTCA ATCCCCTTGT AGCATACCTG ATAAGTGTGG TGAGTTAAAA -2880
GCAGTCCCAT TTACAAAAAG AAAAAGGAAG GCCCATATCT AGCAAAAAAA ATAGACTGCA -2820
TACGTATAGT TGTTTGTGAA AAAGTTCAAG ATGCATACAA GCCGCAGTTT TCTTCAGATA -2760
GTGTGGCATC TTCTTACTTC AAGGAAAAAA ACATTATGCT AGTTTGGAAA TAACTTCAAA -2700
TTTGTCCCTG TGATGGAAAT TAAACCATTG GTAAGTAGTC TAGCAATATC AAACCTAAGG -2640
TGTGTGTTGC ATATGAATTA GGAAAAACCA TGTCAAACCA ACTGAAACCA AGGAAAATCC -2580
ACCATACTAA CATACTTAAA TACCTTGAGG TGAGAAACAT ATAAAGCATA CAGAGAACAT -2520
GATTAGTAAG AATGACGAAG ATAAAATACA CTAAGGTAAT TAGGGAAAAC AGCAAAGTTC -2460
ATTTGGACAT TTGATATCAT GGAAAGCTAT AGAAAAATGT GTACCTTACA GACCGAAATG -2400
GAAAGAGTCC ACGATAAAAA GTCATTTTTG CACCATTTTC CATTGTAATA CTTATCGAGA -2340
CAAATTTATG CGCGCACCTT TTTTCCCCCA TCCATCCAAA TAAATTTTAA TTGGTAAAAC -2280
TTGTGCTTTT ATGACAGCAG GAAGTATCTT TTACAATCTA ATGTACCCAT CAGTACAATA -2220
TTCTAGTAGT ATATCTACAA CAAAAATAAA GATCAAGGGC ATGCTTGGCA CATAGAATTT -2160
TGATGGAAT TAGTTCAAGT CATTTGTTAA GCACATAAAT TTGGCAAAAC TCTCATCTTC -2100
```

CAAATTAACC TTGCAAAATT TAACCAAGAA AAACCTATATA CTATCATCCC GTTCCATGTC -2040
 CTCCTAGTA GCAAACCTTTT TATGCAACCA TTTTTTTTTTC TCGACAGGGC ATTATTCGTG -1980
 GTTACTGTGT GCATTAATAG CATTAATAAC AGCTAGCATG TGAGCCTGTT ATTAGGGGTA -1920
 GGCAGAAAGA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCGGTCC -1860
 TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGTT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
 TAGACGAAAG ACCAAATTAA CAAAAAAAAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
 CAATATAATT AAACCTAAT TTTCACAGCC CTACTTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
 AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTTG TTTTGTGATT TTTGTGTAA AAATTTCCAT -1620
 TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTTCCGGT AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
 TTTGTCCGGT ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
 CGAATATTTT GGTGAGACCG AATGCCCACC CCTACTTGTT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
 ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTTC TAAACTATGA GGCACCTCCT TTTTAATGAA -1380
 AAATCAAACG CGATAACTTT TAATTAAAAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
 GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
 AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
 CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
 CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCCACAATG -1080
 TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
 TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
 GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
 CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
 GGTCAACTTC ATTAAATTTT TCCCTTGGTA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
 TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
 TTCCCGATT CCGTGTAAT AAACCTACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
 TTTTGTATG GGCCAAAACG TGCTTAACCT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTTA -600
 GAAAACCTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT -540
 GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGCAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
 TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
 CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
 CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
 TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
 ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
 TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120

ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
GTTCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA -1

<210> SEQ: ID No: 2

<211> Length: 1911

<212> Type: Nucleic acid

<213> Organism: *Oryza sativa* L. Oc cell

<400> Sequence

```
-1911  GA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCGGTCC -1860
TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGTT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
TAGACGAAAG ACCAAATTAA CAAAAAAAAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
CAATATAATT AACTCTAAT TTTCACAGCC CTACTTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTTG TTTTGTGATT TTTGTGTAA AAATTTCCAT -1620
TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTCGGTC AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
TTTGTGCGTC ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
CGAATATTTT GGTGAGACCG AATGCCCACC CCTACTTGTT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTTT TAACTATGA GGCACCTCCT TTTTAATGAA -1380
AAATCAAACG CGATAACTTT TAATTAAAAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCCACAATG -1080
TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
GGTCAACTTC ATTAAATTTT TCCCTTGGTA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
TTCCCGATT CCGTGTAAT AACTACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
TTTTGTTATG GGCCAAAACG TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTAA -600
GAAAACCTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT -540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTCGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTT TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
```

ACTTTGAGAT CATTCTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
GTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA -1

<210> SEQ: ID NO: 3
 <211> Length: 1034
 <212> Type: Nucleic acid
 <213> Organism: Oryza sativa L. Oc cell
 <400> Sequence

```

-1034                                     AGCTT GTGCATGGCC -1020
TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
GGTCAACTTC ATTAAATTC TCCCTTG GTA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
TTCCCGATTC CCGTGTAAT AACTACTAT TTCATTGCGT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
TTTTGTTATG GGCCAAAAC TGCTTAAC TTGACATAGTT TATTGAAAA AAATAGGTTA -600
GAAAAC TTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGGTTT -540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTCGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG -180
TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
GTTCCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA -1

```

<210> SEQ: ID NO: 4
 <211> Length: 563
 <212> Type: Nucleic acid
 <213> Organism: *Oryza sativa* L. Oc cell
 <400> Sequence

-563	ATCC TAGTATAACC ATCTTGGTTT	-540
GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTGCGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC		-480
TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA		-420
CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTA TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT		-360
CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA		-300
TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG		-240
ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAAACTTTGG		-180
TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT		-120
ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT		-60
GTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAA		-1

<210> SEQ: ID NO: 5

<211> Length: 5392

<212> Type: Nucleic acid

<213> Organism: *Oryza sativa* L. Oc cell

<400> Sequence

-3359

```
GAATTCCTGG TTTAGTTTTC TATTAGTTGG GCACAAGATC ATAAGTGCAG TATTGTATTT -3300
AAGATTCAAC ACAGGTTCAA TTTGTACACAC CCTGTAATTT GGCATCTACA ATCTGAAAAT -3240
GAATGGCTAA TCAAAAGGCT CTGAGCACAC AAATGGCTAA TTTCTTCCAT CTAGTTGAGA -3180
AACCTTTCAA TTATACAAAT GGAAAAGATA TGGATGTGAT TTGTGGGCTG AAAACCCTTT -3120
GATAATCAAC AATTGTTAGT GCCTTCAACT TTCAATGCAC CCATGTTTTT TGTGTACGTT -3060
TGCAAGATCA AAACAATGTT GGAAACGTCA TCTCGCCAGG TAAAGCAATG AATGACGACA -3000
ATTAAGAAGA TTTTGTCTCC TGAAGACTAC TAATGATGGA TATTAAGGGT ATAATAACCT -2940
ATCCAGGATT GTGATGTTCA ATCCCTTGT AGCATACCTG ATAAGTGTGG TGAGTTAAAA -2880
GCAGTCCCAT TTACAAAAAG AAAAAGGAAG GCCCATATCT AGCAAAAAAA ATAGACTGCA -2820
TACGTATAGT TGTTTGTGAA AAAGTTCAAG ATGCATACAA GCCGCAGTTT TCTTCAGATA -2760
GTGTGGCATC TTCTTACTTC AAGGAAAAAA ACATTATGCT AGTTTGGAAT TAACTTCAAA -2700
TTTGTCCCTG TGATGGAAAT TAAACCATTG GTAAGTAGTC TAGCAATATC AAACCTAAGG -2640
TGTGTGTTGC ATATGAATTA GGAAAAACCA TGTCAAACCA ACTGAAACCA AGGAAAATCC -2580
ACCATACTAA CATACTTAAA TACCTTGAGG TGAGAAACAT ATAAAGCATA CAGAGAACAT -2520
GATTAGTAAG AATGACGAAG ATAAATACA CTAAGGTAAT TAGGGAAAAC AGCAAAGTTC -2460
ATTTGGACAT TTGATATCAT GGAAAGCTAT AGAAAAATGT GTACCTTACA GACCGAAATG -2400
GAAAGAGTCC ACGATAAAAA GTCATTTTTG CACCATTTTC CATTGTAATA CTTATCGAGA -2340
CAAATTTATG CGCGCACCTT TTTTCCCCCA TCCATCCAAA TAAATTTTTA TTGGTAAAAC -2280
TTGTTGCTTT ATGACAGCAG GAAGTATCTT TTACAATCTA ATGTACCCAT CAGTACAATA -2220
TTCTAGTAGT ATATCTACAA CAAAAATAAA GATCAAGGGC ATGCTTGGCA CATAGAATTT -2160
TGTATGGAAT TAGTTCAAGT CATTTGTTAA GCACATAAAT TTGGCAAAAC TCTCATCTTC -2100
CAAATTAACC TTGCAAAATT TAACCAAGAA AACTATATA CTATCATCCC GTTCCATGTC -2040
CTTCCTAGTA GCAAACTTTT TATGCAACCA TTTTTTTTTC TCGACAGGGC ATTATTCGTG -1980
GTTACTGTGT GCATTAATAG CATTATAAAC AGCTAGCATG TGAGCCTGTT ATTAGGGGTA -1920
GGCAGAAAGA TCTGAACCGA AAAGACCGAC ACCGAGTAAA TTTGGTCATC AATTCGGTCC -1860
TATATAGTGA AAGACCGAAC TTTATTCGGT CAATTCGGT AGTCTCCTCG GTTAACCGAA -1800
TAGACGAAAG ACCAAATTAA CAAAAAATAA ATCTAAATGC AACCTACAAT CCACCAAGTT -1740
```

CAATATAATT AAACCTCTAAT TTTCACAGCC CTACTTCTTC TAGGCATGCA ACGTAATAAG -1680
 AGTCTTTAGT CATACGTGCT TATGGATTG TTTGTGATT TTTGTGTTAA AAATTTCCAT -1620
 TATTTCTTTG CATATATGAA AATGTTGCTG AATTTGCGTC AGACCGAGAC CGAGACCGAA -1560
 TTTGTGCGTC ATGATATTTT TTGCGTTGAA ATTTGGTCTT TACTTTTCGA AGATCGAGAC -1500
 CGAATATTTT GGTGAGACCG AATGCCACC CCTACTTGTT CTCTCTATAC CCATATGTCA -1440
 ATAATAATTA TTATTATACT CACTCCGTTT TAACTATGA GGCACCTCCT TTTAATGAA -1380
 AAATCAAACCT CGATAACTTT TAATTAAAAA TAATACTAAT ATATACTAAA TATTATGCAT -1320
 GTTATATCAC TATATTTATA TTTTAAAGTA CTTTCATGTA ATGCTAATTT CATATTCGTT -1260
 AAAATATAGA TATTATAATT CAAGATGGAG GAGTACAACC AAACAGTAGA GGATCCACTT -1200
 CCTCTTTATT TATGCCAAGT TATTTTAGAA CCATGCTCCA CACAAGACAC GCACACATCG -1140
 CATTGACATG TGTTAATTTT GTTTCGTGTG GAAAGGCATG GAGGCCGGTT CCCCACAATG -1080
 TCCAATCGCT GCCAACTCTG CGAGTAGAGA AGGGGGAGGA ATGGAAGCTT GTGCATGGCC -1020
 TAAACACACA CTTTGACACT TGACTTTGTG TTGGAATCCA TTGATTAGCC GCTCAATGCA -960
 GCATCCCCAA TGCAGAGGTC TCCCCTCTAC TCCTAGCTCT TTGCAAAACC CAATGTCCAC -900
 CATTGACTTC AATTTCTCAG TCTTCCTTGC TCATGTCTCC CTTGCCCTTC TCTCAACTTG -840
 GGTCAACTTC ATTAAATTTT TCCCTTGGA TGTGCAAAGG CTTTGAAGGT GTAGGCCTGG -780
 TGCAAACATT GCAAAGTCAA AATGTACGGT ACGATGCATC GATTTACTGA CATGGTAATC -720
 TTCCCGATTC CCGTGTAAT AAACCTACTAT TTCATTCGTT TCATTTATAA GATGTTTTAA -660
 TTTTGTATG GGCCAAAACCT TGCTTAACTT TGACATAGTT TATTGAAAAA AAATAGGTAA -600
 GAAAACCTAA ATTCAGGAAA AAAAGATAGG TGAGATATCC TAGTATAACC ATCTTGTTTT -540
 GGTTAAGACA TGCCTTAGAA TAGACGAGTC GGTCGAAACG GTCAGAATCG GTAGCGTCCC -480
 TTTAGAAACG ACGCTCAATC GACCTGTAAT TGACCGTATT TATCATTTAC AACATTAATA -420
 CAATGCAAAA AGAAATTAGA AATTTTTTTT TAAATAGTCA AAAATGGTAC GCCAGTCTAT -360
 CGGGAATTTA TGTGACCGTT TTCACCCCTA TTCGAGTGCA TGGGCACTTG AGTTGTAAAA -300
 TTGACTTGAT CGAGATACCA ACGTATATAC AATTTACACA TCGAATTGCC GGGAAATTGG -240
 ACTTTGAGAT CATTTTAGCT CCCCAAGGCG ATCCACACGT ACTCTACCAC AAACTTTGG -180
 TTGTTTTTGC TATCATCTCA AGGCCACTGC AGCATGCGCA TTGCGCACGT ACGAGATGCT -120
 ACTCTTTCCA AGGAACCGAT GTCTCTCTCT CTCTCTCCAG CCTCCATTGC TTATAAATAT -60
 GTTCCTCCTT CCTATACTGG TAATGGCAGC AAAGCAAAGA AACAAAGAAG AAGAAGAAAAG 1
 AAGAAGCAGC AGCAAAAAAG TTGATCAGTT AATTAGCAAG TGTGTTCTTC TTTCTTTTGG 61
 TGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGATCTCAGA ATGGTGAATC CAGGAAGAAC 121
 AGCTAGGGCA CTCTGCCTCC TATGCCTTGC TCTCCTCTG CTAGGTCAAG ATACCCATTC 181
 CAGGAAGCTC CTGTTGCAGG AGAAGCACAG CCATGGCGTC GGCAACGGCA CAACCACCAC 241

CCAGGTCAGC	AGAATTAGTT	CAGTATCGTT	TCTTCAGCTT	ATTAACCGTG	GCCAAATTTG	301
AATTCTATAA	CTTAATTTTA	GAGTTGATGT	GGATGTGTTA	TTAATCATAG	ATTATTTCTC	361
AACATTGGGT	TTTATGCCGC	TAATAACACA	TATGTAAAAC	CTTTACAAAC	AAATTATTTT	421
TCGGTCGCTA	ATAAGCGTTA	CGGCTTATAA	TTTTCCTAGT	GAACAGTGCA	TGCATTTTGC	481
AAACTTCTTG	TTGGCTCTGG	TTGCAACTTG	CAAGCACGCA	TATGCATTGA	GAGAAGAGTT	541
CATACACACA	CTGTATTATA	TATATGTACA	TTTGGGGTAT	AAGATACTAA	AATGAAACAG	601
GAGCATCGTG	TTCTGAAATG	GCGTGGCGTT	CTTGTTTATT	TTCAGCTTGT	GTAATTGCTG	661
GAGGGCAATA	GCATGGGAAA	ACACTCTAAT	CTGAATCTGT	GACACCTGGA	ACAGTAGCAC	721
CATTCTTGAT	GGCATAATCA	TGTCTTAACC	ACATGTCTAT	CGTTGGAATC	CTGGTACAAT	781
GCTCCGAGCT	GCATCGATCC	ATCCATGCAT	GTTACCTCCA	TGTGTTCGAA	GATGCTATAT	841
ATTTGCATAC	GACAGGCACA	GCTTCATGAA	TGTACTTCGG	CACTGTCTTA	CCAAACTCCC	901
CTCCGTTTCA	TATTATAAGT	CATTTGATTT	TTTTTTCCTA	GTCAAGTATG	ACCAAGCTTA	961
TAGAAAAAAT	TAGAAACATC	TAAAATAACA	AACTAGTTTC	AGAAAATCTA	ACATTGAATA	1021
TATTTTGATA	ATATATTTGT	TTTGGGTGA	AAATACTAGT	ATATTTTTCA	ATAAACTTGG	1081
TCCAACCTAA	CTAGAAAAAA	AATCAAACGA	CTTATAATAT	GAAACGGAGG	GAGAACTTTC	1141
GTTTTGATTT	TCCAAAGAAC	GACATTATCT	TAATTTTAAG	ACATCGTTAT	TGTTTTTAAA	1201
ATAATAATAG	GATCACTAGT	TTCTATTACA	ATATATTTGT	AAAACACAAT	AATATGACAA	1261
TATTATAGAG	GTAGTACTAC	TTTTTGATAT	TTCCATACAC	CCAATCTATA	AATTGATCAA	1321
AGTTTCTGCT	TCCACTCTGT	TTCGTTCTGT	CTTGAAAGTT	TTCTTCTAAC	AGTATGATGA	1381
TCTTGATCAA	TCAGGAACCA	AGCAGAGAGA	ATGGAGGAAG	TACAGGTTCC	AATAACAATG	1441
GGCAGCTGCA	GTTTGATTCA	GCCAAATGGG	AAGAATTCCA	CACGGATTAT	ATCTACACCC	1501
AAGATGTCAA	AAACCCATAA	TGGCTGTTCA	TTTATGATTT	GAAC TAGTAC	TAGTAGCTTA	1561
TACCTTCTGC	GCGTCTTTTG	TTCGTTTGGA	GAGGGGATTT	TCTTGGGATT	TAGCATATGA	1621
ACTAATTAAA	TTAAATCCCA	GGCAAATCCC	ACTCAGCCCA	TTTTGTGCAG	AAGTTGTCAG	1681
TGTGCACTGT	ATAATTATTT	AGTCATACAC	AACTACTCCT	GGTAACTACT	CCTATCTTCG	1741
ATGAATTTTC	TGGTTTTGCC	AGACGTGACA	ATAGTCCAGT	AGCATGCAGT	ACCCTCTCAG	1801
AATCCCTGTA	ATTTTTAGCA	AAAAAAAAG	GAAGAAAAGA	AAAGAAGCTT	CCCTACTTTC	1861
TCCGTTTCAC	AATGTAAGTC	ATTCTAGCAT	TTTCTACATT	CATATTGATG	TTAATGAATC	1921
TGGATAGATA	TATACTCCCT	CCGTCGAAAA	AAAAAAAAGG	AAACTGTGGG	TTCCGTGCTA	1981
ACGTTTGA	GTCCGCTTAT	ATGAAATTTT	TTTATAATTA	GGATTTTCAT	TG	2033

[Effect of the Invention]

According to this invention, a novel promoter sequence derived from rice phytosulfokine precursor gene was provided. The promoter has higher promoter activity than califlower mozaic virus 35S promoter.

[Brief Description of the Drawing]

[Fig. 1] Fig. 1 is a photograph of blotting analysis performed on genomic DNA of rice Oc cell using cDNA of *OsPSK* as a probe.

[Fig. 2] Fig. 2 is a schematic diagram showing restriction map of *OsPSk* genomic gene and genomic structure of the *OsPSK* gene.

[Fig. 3] Fig. 3 is a photograph showing result of primer extension reaction and S1 mapping.

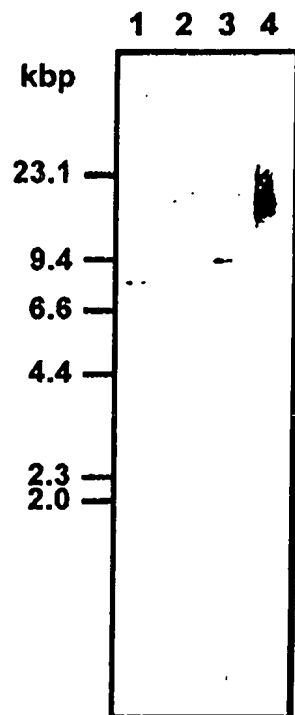
[Fig. 4] Fig. 4 is a figure showing base sequence of *OsPSK* gene and its deduced amino acid sequence.

[Fig. 5] Fig. 5 is a schematic diagram showing structure of *OsPSK*-intron-GUS constructs.

[Fig. 6] Fig. 6 is a figure showing in GUS activity of Oc cells transformed with *OsPSK*-intron-GUS constructs.

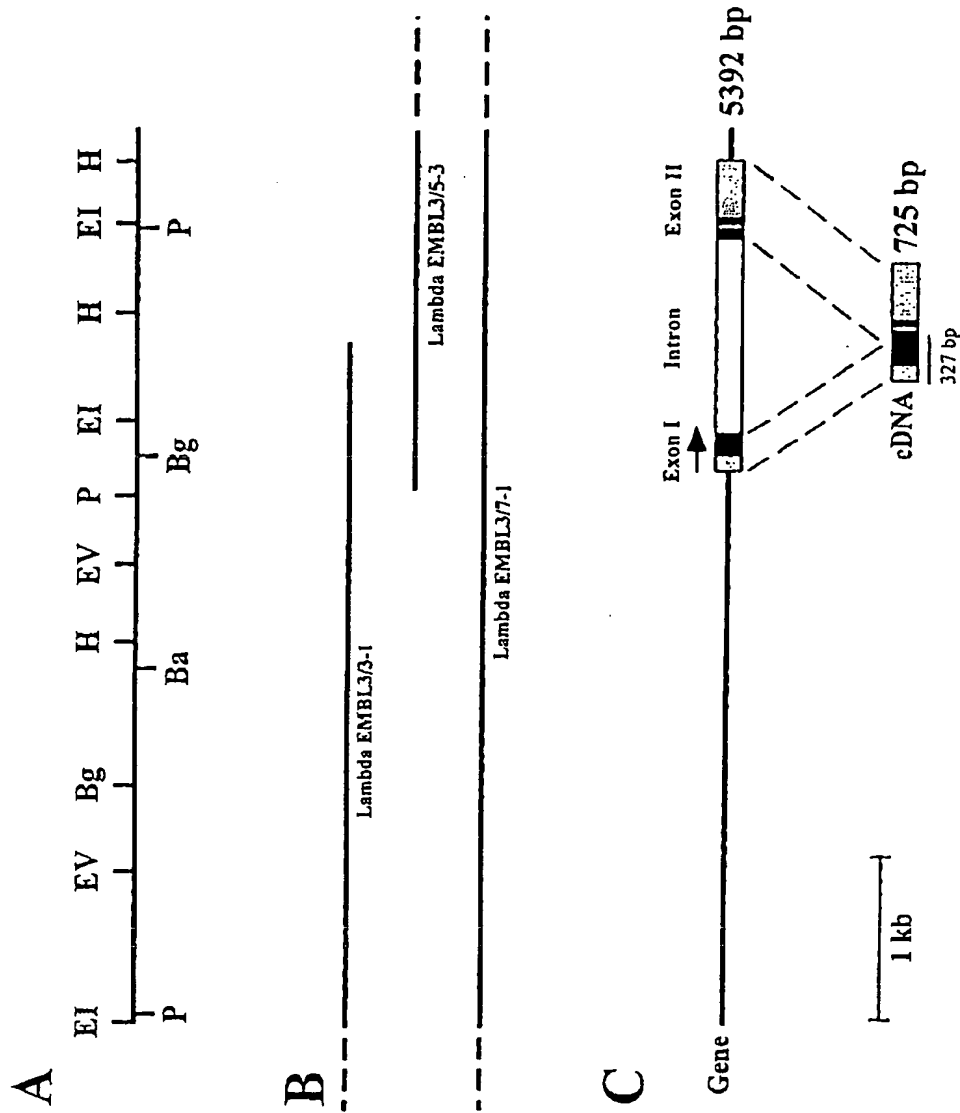
[Fig. 7] Fig. 7 is a photograph showing regulation of *OsPSK ::GUS* gene by auxin and cytokinin.

【書類名】 図面
[Identification of Document] Drawing
【図1】
[Fig. 1]



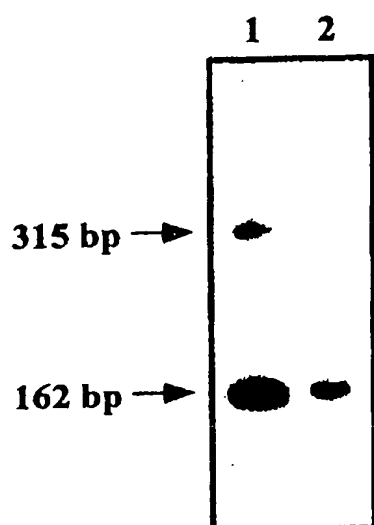
整理番号=2000P039

【図2】
 [Fig. 2]



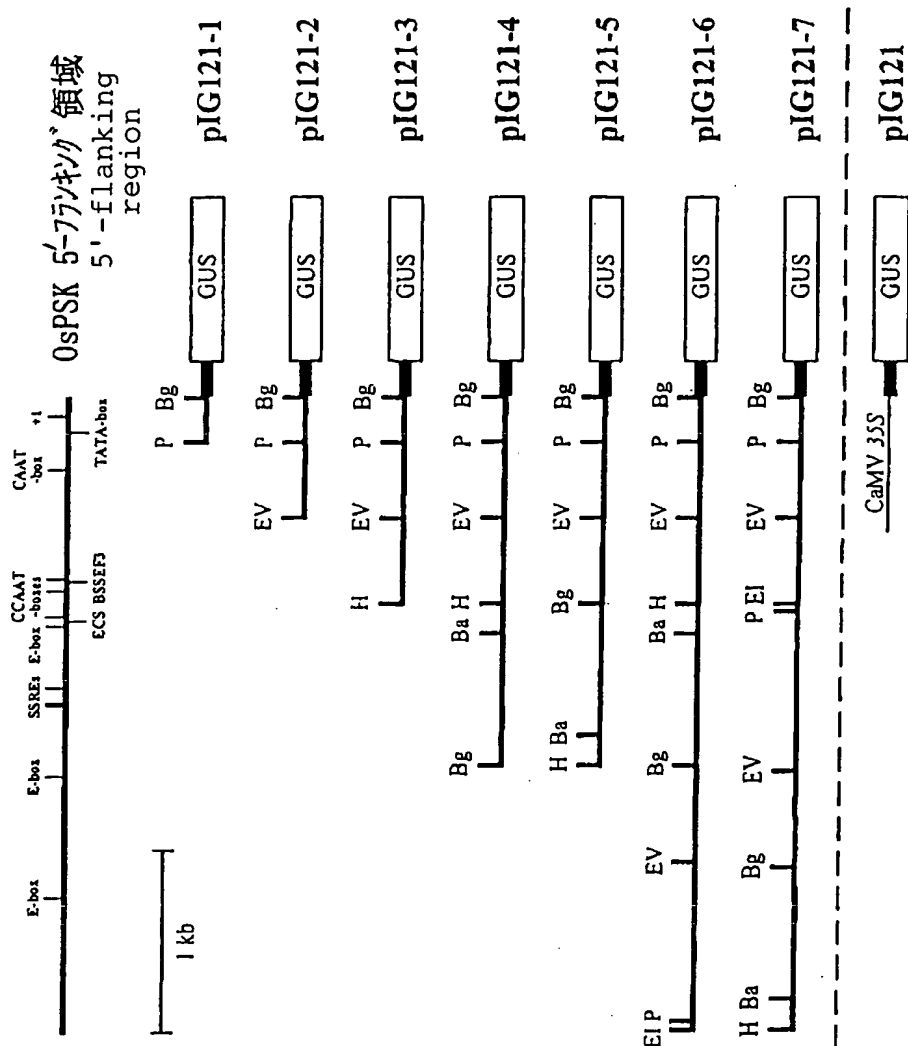
【図3】

[Fig. 3]

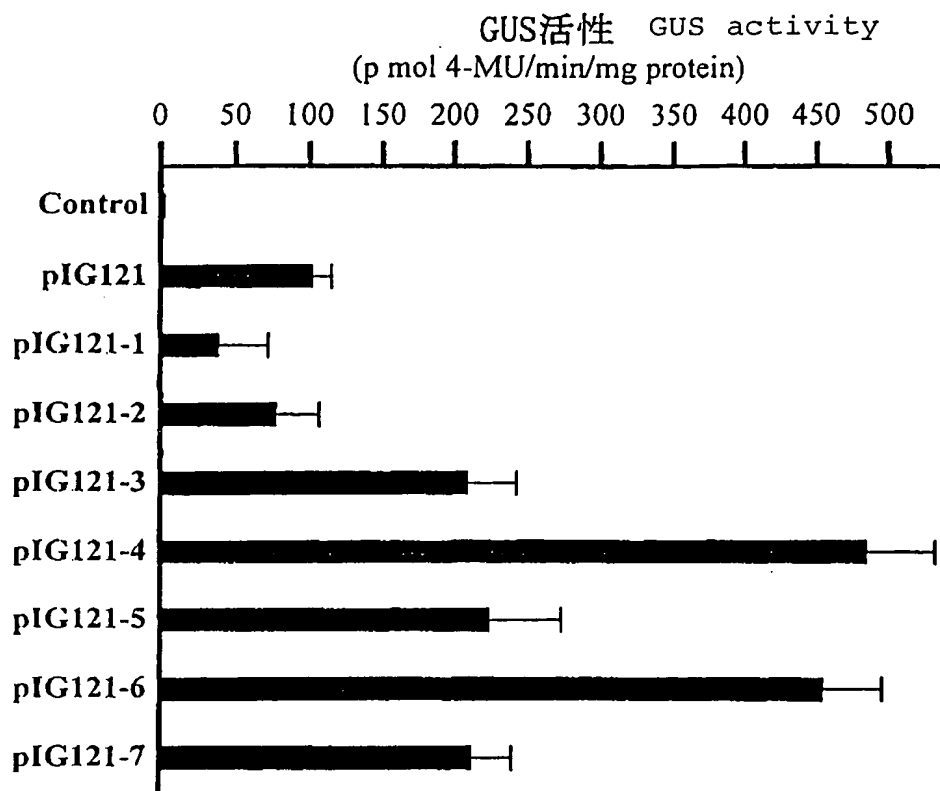


【図5】

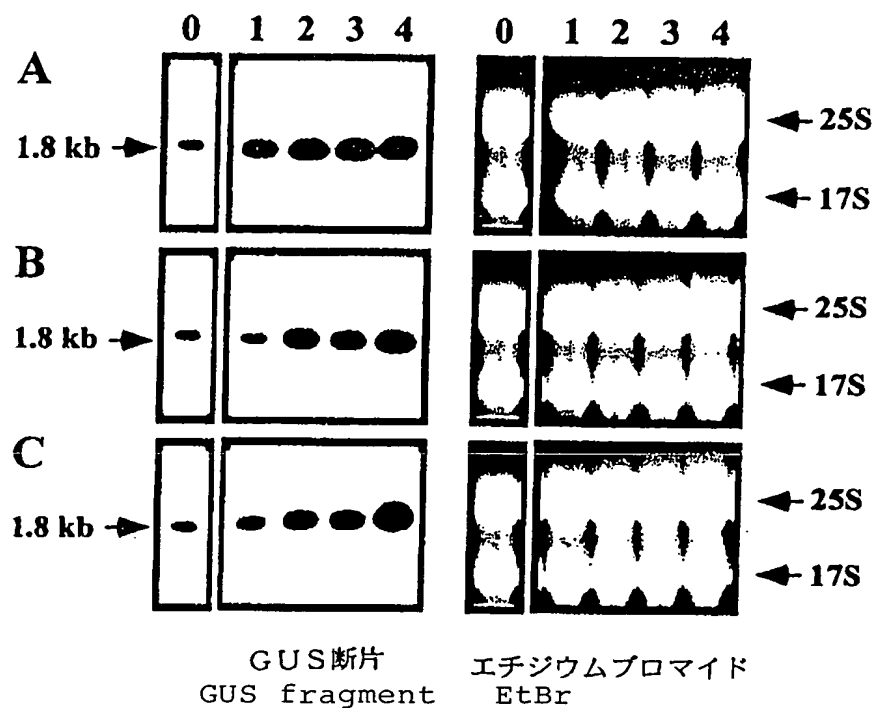
[Fig. 5]



【図6】
[Fig. 6]



【図7】
 [Fig. 7]



[Identification of Documents] Abstract

[Abstract]

[Object] The object of this invention is to obtain a novel promoter having higher promoter activity than that of califlower mozaic virus 35S promoter.

[Construction] This invention provides a novel promoter derived from gene of phytosulfokine precursor of rice.

[Selected Figure] none